



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



FLÁVIA BARRIO LOPES

Planejamento e síntese de uma série de derivados aril-
alquilpiperazínicos com potencial atividade anticolinesterásica em
uma abordagem multialvo

DIADEMA

2021

FLÁVIA BARRIO LOPES

Planejamento e síntese de uma série de derivados aril-
alquilpiperazínicos com potencial atividade anticolinesterásica em
uma abordagem multialvo

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, ao Instituto de Ciências
Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
da Universidade Federal de São Paulo –
Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo dos
Santos Fernandes

DIADEMA

2021

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Lopes, Flávia Barrio

Planejamento e síntese de uma série de derivados aril-
alquilpiperazínicos com potencial atividade anticolinesterásica em
uma abordagem multialvo / Flávia Barrio Lopes. – – Diadema, 2021.
58 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2021.

Orientador: João Paulo dos Santos Fernandes

1. Acetilcolinesterase. 2. Anticolinesterásicos. 3.
Neurodegeneração. 4. Cognição. I. Título.

FLÁVIA BARRIO LOPES

Planejamento e síntese de uma série de derivados aril-
alquilpiperazínicos com potencial atividade anticolinesterásica em
uma abordagem multialvo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes – UNIFESP

MSc. Michelle Fidelis Corrêa – UNIFESP

MSc. Marina Themoteo Varela – UNIFESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à FAPESP pelo importante auxílio durante a execução deste trabalho, através da bolsa concedida no período referente ao processo 2019/23696-7.

Em segundo lugar, agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste projeto. Para mim ele representa o encerramento de um ciclo, um longo período que pôde trazer para minha vida pessoas muito importantes, além de muito aprendizado e experiência. Por isso, a minha gratidão não se refere apenas à realização de um trabalho de pesquisa e escrita, mas sim, ao apoio que tive em toda essa jornada.

RESUMO

O envolvimento de vias colinérgicas com processos cognitivos, principalmente associados ao aprendizado e formação da memória, tem feito com que a busca por fármacos com a capacidade de atuar nessas vias seja promissora para o tratamento de doenças relacionadas à demência, como, por exemplo, a Doença de Alzheimer. Nesse sentido, este trabalho objetivou planejar, sintetizar e avaliar uma série de derivados aril-alkilpiperazínicos, com variações no anel aromático, na cadeia alquílica e no nitrogênio terminal, como agentes anticolinesterásicos. O planejamento da série levou à construção de compostos com grupos funcionais ureída e amida, contendo como grupamentos básicos a 1-fenilpiperazina e a 1-(4-piridil)piperazina. Devido à semelhança dos ligantes planejados com antagonistas de receptores H₃ de histamina, a série também pode ser vista sob uma perspectiva multialvo. Foram obtidos quatro compostos finais, com rendimentos que variaram de 10 % a 67 %. Estes foram testados quanto à capacidade de inibição da acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* em duas concentrações fixas, 1 µM e 100 µM, e o composto **5d** foi o mais eficaz em inibir a atividade da enzima (48 % de inibição a 100 µM). Tais resultados, quando avaliados de acordo com as características estruturais individuais, contribuem com informações de REA importantes para otimizar a atividade de novos compostos, e futuros estudos com outros derivados que estão em andamento.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Anticolinesterásicos. Neurodegeneração. Cognição.

ABSTRACT

The involvement of cholinergic pathways with cognitive processes, mainly associated with learning and memory formation, has made the search for drugs with the ability to act in these pathways promising for the treatment of diseases related to dementia, such as, for example, Alzheimer's Disease. In this regard, this work aimed to design, synthesize and evaluate a set of aryl-alkylpiperazine derivatives, with variations in the aromatic ring, the alkyl chain and the terminal nitrogen, as anticholinesterase agents. The design of this series led to the construction of compounds with ureide and amide functional groups, and containing 1-phenylpiperazine and 1-(4-pyridyl)piperazine as basic groups. Due to the similarity of the designed ligands with histamine H₃ receptors antagonists, the series can also be seen from a multi-target perspective. Four final compounds were obtained, with yields ranging from 67 % to 10 %. These were tested for ability to inhibit *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase in two predetermined concentrations, 100 μ M and 1 μ M, being the compound **5d** the most effective in inhibiting the enzyme (48% at 100 μ M). Such results added important SAR information to optimize the activity of new compounds, and studies with novel compounds are in progress.

Keywords: Acetylcholinesterase. Anticholinesterases. Neurodegeneration. Cognition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Antagonistas/agonistas inversos de receptores H_3	16
Figura 2 – AChEI utilizados na clínica	18
Figura 3 – Síntese e hidrólise de ACh pelas enzimas ChAT e AChE, respectivamente	19
Figura 4 – Representação do CAS e PAS da AChE	21
Figura 5 – Inibidores das colinesterases	23
Figura 6 – Estudo de ancoragem molecular do composto SH2004 em AChE de <i>Torpedo californica</i>	24
Figura 7 – Antagonistas H_3R com potencial atividade pró-cognitiva	25
Figura 8 – Agentes com características de ação multialvo, combinando atividade anticolinesterásica e antagonista H_3R	26
Figura 9 – Compostos planejados com potencial afinidade por $H_3R/AChE$	29
Esquema 1 – Procedimento sintético para as ureídas intermediárias (2)	30
Esquema 2 – Procedimento sintético para as amidas intermediárias (4)	30
Esquema 3 – Procedimento sintético para os compostos finais (5)	31
Figura 10 – Mecanismo geral da síntese das benzilureias	32
Figura 11 – Mecanismo geral da síntese das amidas com a associação de EDC e HOBt	34
Figura 12 - Esquema representativo de uma S_N2 e S_N1 , respectivamente	36
Figura 13 - Compostos finais obtidos	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade da AChE medida após incubação com os compostos finais	40
Tabela 2 – Dados experimentais referentes à síntese das ureídas	43
Tabela 3 – Dados experimentais referentes à síntese das benzilamidas	44
Tabela 4 – Dados experimentais referentes à síntese dos compostos finais	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGIAS

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AChEI – Inibidores de acetilcolinesterase
ASChI - Acetiltiocolina
BuChE - Butirilcolinesterase
ChAT – Colina acetiltransferase
DA - Doença de Alzheimer
DCC - *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida
DCM - Diclorometano
DH - Doença de Huntington
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DP - Doença de Parkinson
DTNB - 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EeAChE - *Electrophorus electricus* acetilcolinesterase
EDC - N-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELA - Esclerose lateral amiotrófica
eq. - Equivalente
GABA – Ácido gama-aminobutírico
Glu – Aminoácido glutamato
GP – Grupo de partida
H₃R - Receptores H₃ de histamina
His – Aminoácido histidina
HOBt - 1-hidroxibenzotriazol
IC₅₀ – Concentração inibitória média
JNM – Junção neuromuscular
LTD - Depressão de longo prazo
LTP - Potenciação de longo prazo
mAChRs – Receptores colinérgicos muscarínicos
MeOH - Metanol
nAChRs – Receptores colinérgicos nicotínicos
PAS – Sítio aniônico periférico

ppm – Partes por milhão

REA – Relação estrutura-atividade

Rf – Fator de retenção

RMN ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Ser – Aminoácido serina

S_N1 – Substituição nucleofílica unimolecular

S_N2 - Substituição nucleofílica bimolecular

SNC – Sistema nervoso central

TDAH – Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade

TRA – Trietilamina

t.a. – Temperatura ambiente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Processos relacionados à cognição	14
1.2 Vias colinérgicas associadas à cognição – importância da AChE	17
1.3 Considerações relevantes para o planejamento dos compostos	25
2 OBJETIVOS	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 Planejamento dos compostos	29
3.2 Preparação dos compostos	29
3.2.1 Síntese das ureídas	30
3.2.2 Síntese das benzilamidas	30
3.2.3 Síntese dos compostos finais 5a-d	31
3.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Preparação dos compostos	32
4.1.1 Síntese das ureídas	32
4.1.2 Síntese das benzilamidas	33
4.1.3 Síntese dos compostos finais	35
4.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica	39
5 CONCLUSÕES	42
6 EXPERIMENTAL	43
6.1 Síntese das ureídas	43
6.2 Síntese das benzilamidas	44
6.3 Síntese dos compostos finais	45
6.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

A demência é o distúrbio que ocorre quando há uma pronunciada perda das funções cognitivas, em processos relacionados ao aprendizado e memória. Este distúrbio gera interferências no funcionamento ocupacional, doméstico e social do indivíduo (GALE; ACAR; DAFFNER, 2018).

Aspectos genéticos, endógenos e ambientais estão relacionados com a origem da demência, que pode ser causada por diversos fatores. Dentre estes podem ser destacados tumores cerebrais, doença cerebrovascular, abuso crônico de álcool, deficiências de vitaminas (por exemplo, vitamina B12 e tiamina), hipotireoidismo, infecções virais e as doenças neurodegenerativas. O envelhecimento natural do organismo também pode levar à demência, neste caso, como uma forma de déficit cognitivo leve (BALDUCCI; FORLONI, 2019; GALE; ACAR; DAFFNER, 2018; MEGURO; DODGE, 2019; SOUSA et al., 2009).

Apesar das doenças neurodegenerativas não serem a única causa de demência, tal problema acabou sendo atrelado a este conjunto de doenças por conta do foco dado à doença de Alzheimer (DA). Que abrange cerca de 60% a 80% dos casos de demência, com expressivo acometimento de indivíduos idosos (CASS, 2017; GALE; ACAR; DAFFNER, 2018). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 91% dos casos de demência se iniciam a partir dos 65 anos, contribuindo para a incapacidade e dependência neste grupo populacional (WHO, 2020).

De maneira geral, as doenças neurodegenerativas compreendem uma variedade de distúrbios neurológicos que afetam principalmente os neurônios do sistema nervoso central (SNC). Essas doenças são conhecidas por suas bases moleculares características, como dinâmica proteica anormal, com dobradura incorreta, agregação e degradação defeituosa dessas proteínas, estresse oxidativo, neuroinflamação, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, danos ao DNA, interrupção do transporte axonal e apoptose (JELLINGER, 2009; MOHD SAIRAZI; SIRAJUDEEN, 2020).

Como resultado destas alterações ocorre a morte neuronal em regiões cerebrais específicas, com consequente perda de função, determinando algumas das manifestações clínicas presentes em cada doença, sendo a demência sinal observado em várias doenças neurodegenerativas (DUGGER; DICKSON, 2017). Além da DA, a doença de Parkinson (DP) e de Huntington (DH), a esclerose lateral amiotrófica (ELA), a demência fronto-temporal, a esclerose múltipla (EM) e a demência com corpúsculos de Lewy são exemplos de condições

em que a demência é observada (CHI; CHANG; SANG, 2018; FAROOQUI, 2016; WAUTERS et al., 2017).

Com o aumento da expectativa de vida deixando seu foco nos países mais ricos e se aproximando da realidade de países em desenvolvimento, a demência tem se tornado cada vez mais uma condição clínica de interesse mundial, podendo se tornar um problema de saúde pública daqui a alguns anos (JUAN; ADLARD, 2019). No entanto, ainda faltam terapias eficazes, capazes de retardar o aparecimento dos sintomas relacionados à perda cognitiva, ou de atingir seu foco (ELLIOTT, 2020; LOPEZ; KULLER, 2019).

Hoje se sabe que as demências não se resumem apenas aos déficits em tarefas de aprendizado e memória, mas incluem também distúrbios comportamentais, afetivos e emocionais (TREVISAN et al., 2019). Dessa maneira, o tratamento de tais doenças pode contribuir com a melhoria na qualidade de vida de indivíduos de que são acometidos, assim como dos responsáveis pelos seus cuidados, sejam eles parentes, amigos ou profissionais da saúde. Tais avanços poderiam ainda colaborar com reduções em custos com alternativas terapêuticas e internações, gerando economia em gastos com a saúde coletiva (PRINCE et al., 2013).

Esses fatores justificam a busca por novas terapias que visem reduzir a perda cognitiva presente em muitos distúrbios que acometem o SNC. Como a abordagem multialvo, que propõe o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes por atuarem de maneira mais abrangente, envolvendo mais de uma via. Estudos têm demonstrado os benefícios obtidos através dessa estratégia, principalmente no tratamento de doenças complexas, como a DA e outros distúrbios neurodegenerativos, conhecidos por suas características multifatoriais (CHO et al., 2011; VIJAYAN; CHANDRA, 2019).

Assim, dentro do contexto das funções cognitivas, é importante ressaltar o papel de dois sistemas em particular, o colinérgico e o histaminérgico, onde a atuação mútua em alvos farmacológicos relevantes presentes em ambas as vias pode levar a melhores respostas terapêuticas (BLANDINA et al., 2004; PURÓN-SIERRA; MIRANDA, 2014). Dentre esses alvos, podem ser destacados a enzima acetilcolinesterase (AChE) e os receptores H₃ de histamina (H₃R), cuja inibição conjunta desempenha um efeito sinérgico capaz de estimular a atividade dos dois sistemas (CHO et al., 2011; ŁAŻEWSKA et al., 2016).

Dessa forma, visando contribuir para a ampliação das terapias disponíveis direcionadas aos distúrbios cognitivos, este trabalho teve como objetivo planejar, sintetizar e avaliar novos

compostos com potencial atividade anticolinesterásica. Como o desenvolvimento da série foi guiado pela abordagem multialvo, houve o propósito de produzir ligantes capazes de atuar também em receptores H₃R. A partir dos resultados obtidos foram adquiridas informações de REA úteis para a otimização de novos compostos, melhorando perfis de atividade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Processos relacionados à cognição

A cognição é uma importante função reconhecida por abranger tanto a aquisição de informações do meio externo, através de estímulos sensoriais e/ou emocionais, como a capacidade de armazenar essas informações por períodos de tempo curtos ou longos, sendo tais processos conhecidos como aprendizado e memória (GAREAU, 2016; HOROWSKI et al., 2003). Durante os processos cognitivos, as conexões neuronais são passíveis de reconfigurações, reforçando ou formando conexões sinápticas importantes para a realização de determinadas tarefas, ao mesmo tempo em que enfraquece ou desfaz conexões que poderiam atrapalhar a aquisição de novos conhecimentos, ou que eventualmente não são mais necessárias (MALENKA; BEAR, 2004).

Essa capacidade plástica do SNC é formada através de alterações das forças das sinapses, permitidas através do aprendizado, de forma que as reconfigurações neuronais determinam a formação da memória. Quando a transmissão de impulsos nervosos é forte o suficiente para estabelecer ou reforçar uma conexão relativamente duradoura entre neurônios, ocorre um processo chamado de potenciação de longo prazo (*long-term potentiation*, LTP). Enquanto depressão de longo prazo (*long-term depression*, LTD) é o nome dado aos eventos que levam ao enfraquecimento entre conexões sinápticas (MANSVELDER; VERHOOG; GORIOUNOVA, 2019; MEDAGLIA; LYNALL; BASSETT, 2015).

Mecanismos moleculares como a ativação de fatores de transcrição que culminem em alterações na síntese proteica, em conjunto com outras modificações na atividade celular tanto de neurônios como de células da glia, também são mecanismos usados para o armazenamento de informações no SNC (TONG; PEACE; CLELAND, 2014). Da mesma forma, vários mecanismos celulares são necessários para a recuperação de informações retidas, durante a recordação, sendo esta também considerada uma função cognitiva (SOLÍS; LÓPEZ, 2009).

A capacidade cognitiva se mostra então como uma atividade complexa e que, portanto, não se resume apenas ao aprendizado e memória. Para que novas informações sejam aprendidas, outras ações são necessárias a nível central, como a atenção e excitação, ciclos de sono e vigília e, ainda, sistemas de recompensa (BONINI et al., 2011; RAMASWAMY; COLANGELO; MARKRAM, 2018). O envolvimento de diferentes processos determina a participação de mais de uma região cerebral, com ênfase para regiões como o córtex pré-frontal, hipocampo, lobo temporal-medial, estriado, entre outras, com consequente participação de

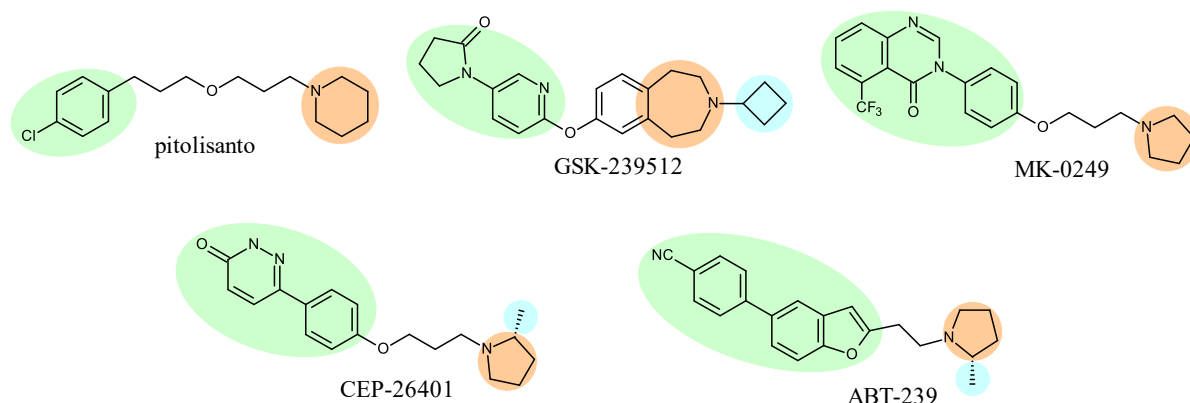
diferentes neurotransmissores, dentre os quais merecem destaque, a acetilcolina e a histamina (BORBÉLY; SCHEICH; HELYES, 2013; DERE et al., 2008).

A histamina tem sido considerada um importante neuromodulador a nível central, muito por conta de sua capacidade de regular processos comportamentais e autônomos como apetite, ingestão hídrica, atividade motora e nocicepção, bem como ações cognitivas relacionadas à atenção e vigília. No entanto, grande parte de seu reconhecimento atual deve-se à atuação deste mediador químico em receptores H₃R (CORRÊA et al., 2019; PARSONS; GANELLIN, 2006).

Em nível central, os H₃R se localizam pré-sinápticamente nos neurônios histaminérgicos e, por estarem acoplados à proteína $G\alpha_{i/o}$, seu estímulo através da interação com a histamina leva a uma cascata inibitória envolvendo segundos mensageiros que, entre outros fatores, resulta em menor influxo de cálcio celular, diminuindo a síntese e liberação de histamina (GHAMARI et al., 2019; BONINI et al., 2011; PROVENSÍ et al., 2020; ROCHA et al., 2014). Entretanto, sua expressão pré- e pós-sináptica em outros tipos de neurônios, permite que os H₃R possam agir tanto como auto quanto como hetero-receptores regulatórios, sendo responsáveis pela redução da liberação de outros mediadores químicos além da histamina, como a ACh (JI; SUGA, 2013; KUDER et al., 2016). Consequentemente, o bloqueio desses receptores por meio de antagonistas/agonistas inversos pode resultar no estímulo da atividade tanto de vias histaminérgicas como colinérgicas, sem contar com o efeito em vias de outros neurotransmissores também regulados pela histamina, como glutamato, dopamina e GABA (PROVENSÍ et al., 2020b).

Considerando o potencial regulatório que o H₃R tem na fisiologia cerebral, antagonistas/agonistas inversos deste receptor tem potencial terapêutico em diversas desordens que afetam o SNC, como a esquizofrenia, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e demências, o que tem levado ao desenvolvimento de diversos compostos com o objetivo de bloquear a atividade histaminérgica em H₃R. Atualmente, o único antagonista de H₃R aprovado para uso clínico é o pitolisanto (Figura 1), para o tratamento da narcolepsia com ou sem cataplexia (BAJDA et al., 2020; BONAVENTURE et al., 2007). No entanto, outros compostos têm se mostrado promissores, como é o caso dos antagonistas/agonistas inversos ABT-239, GSK-239512, MK-0249 e CEP-26401 (Figura 1) (GHAMARI et al., 2019; ŁAŻEWSKA; KIEĆ-KONONOWICZ, 2018; LEURS et al., 2011).

Figura 1 - Antagonistas/agonistas inversos de receptores H₃



Fonte: BAJDA et al., 2020; BONAVENTURE et al., 2007; WINGEN; STARK, 2013.

Dentre estes compostos, o GSK-239512 e o MK-0249 concluíram a fase II de ensaios clínicos, pela potencial capacidade em tratar a desmielinização em indivíduos com esclerose múltipla e pelo tratamento de déficit cognitivo em pacientes com esquizofrenia e TDAH, respectivamente (CLINICALTRIALS.GOV, 2021; EGAN et al., 2013; HERRING et al., 2012; WINGEN; STARK, 2013). O composto CEP-26401 concluiu em 2013 estudos de fase I em ensaios clínicos, com potenciais efeitos pró-cognitivos já demonstrados em modelos animais (BAAKMAN et al., 2019; CLINICALTRIALS.GOV, 2021; RADDATZ et al., 2012).

Diferentemente da histamina, o envolvimento da acetilcolina (ACh) com processos cognitivos é um conceito que já vem sendo bastante explorado ao longo dos anos. Estudos farmacológicos em seres humanos demonstraram conclusivamente que o bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs) por fármacos como a escopolamina dificultam a formação da memória, mas não a evocação da memória previamente formada (NICOLL; MALENKA, 1995; SUGISAKI et al., 2016). Já em modelos murinos, a administração de atropina foi responsável por impedir o aumento da memória induzido pela administração pós-treinamento de substâncias pró-cognitivas (POWER; VAZDARJANOVA; MCGAUGH, 2003). Por outro lado, agonistas de receptores nicotínicos (nAChRs) foram capazes de estimular a aquisição de nova informação (TITUS et al., 2019).

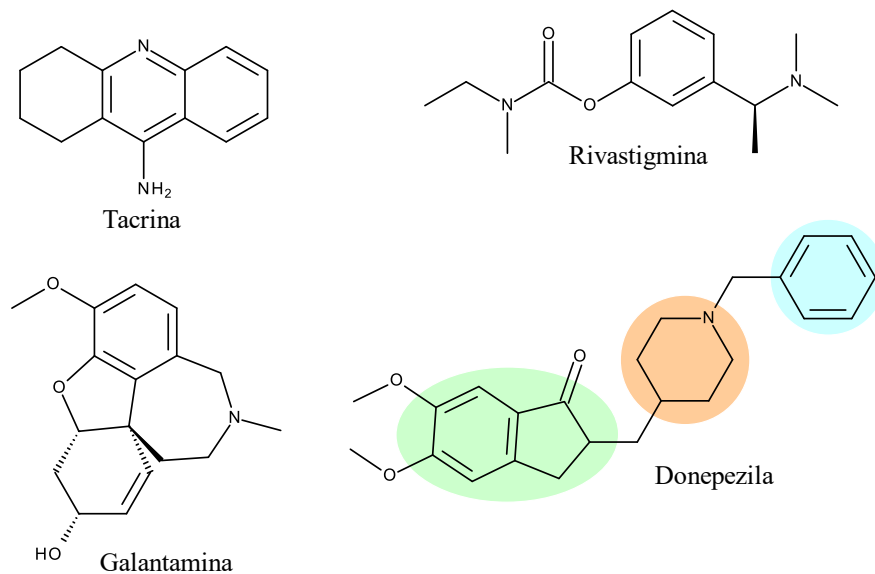
1.2 Vias colinérgicas associadas à cognição – importância da AChE

A presença de transmissões colinérgicas em áreas específicas do SNC, tais como córtex, hipocampo e amígdala, revelam seu envolvimento em processos de aprendizado, memória e excitação, além da regulação de estados de consciência como alerta, sono e vigília (KANDEL et al., 2014; NIROGI et al., 2010; WOOLF, 1991). Foi demonstrado que os níveis de acetilcolina no SNC variam com o ritmo circadiano, e diversos trabalhos demonstraram sua estimulação da LTP em muitas áreas do cérebro, principalmente através da atividade em mAChRs do tipo M₁ presentes no hipocampo (GROSSBERG, 2017; MASUOKA et al., 2019; STONE, 1994).

Além dos receptores M₁, existem outros quatro tipos de receptores colinérgicos metabotrópicos, numerados até M₅, sendo os tipos pares, de caráter inibitório e os ímpares, de caráter excitatório (NATHANSON, 2013). Todos podem ser encontrados no SNC, com foco para a presença dos tipos M₁ e M₂ na amígdala e no hipocampo, região onde também são observados receptores M₄. Demonstrando a importância desses receptores para os processos que envolvem a formação da memória (PEDERSEN; BERGQVIST; LARHAMMAR, 2018; POWER; VAZDARJANOVA; MCGAUGH, 2003).

A acetilcolina também é capaz de atuar em receptores ionotrópicos, representados pelos nAChRs, envolvidos com o aumento da permeabilidade a íons catiônicos excitatórios, principalmente Na⁺ (ALBUQUERQUE et al., 2009). No SNC essa classe de receptores está presente no hipocampo, participando da conversão da potenciação de curto prazo em LTP e auxiliando na modulação da plasticidade sináptica (TITUS et al., 2019).

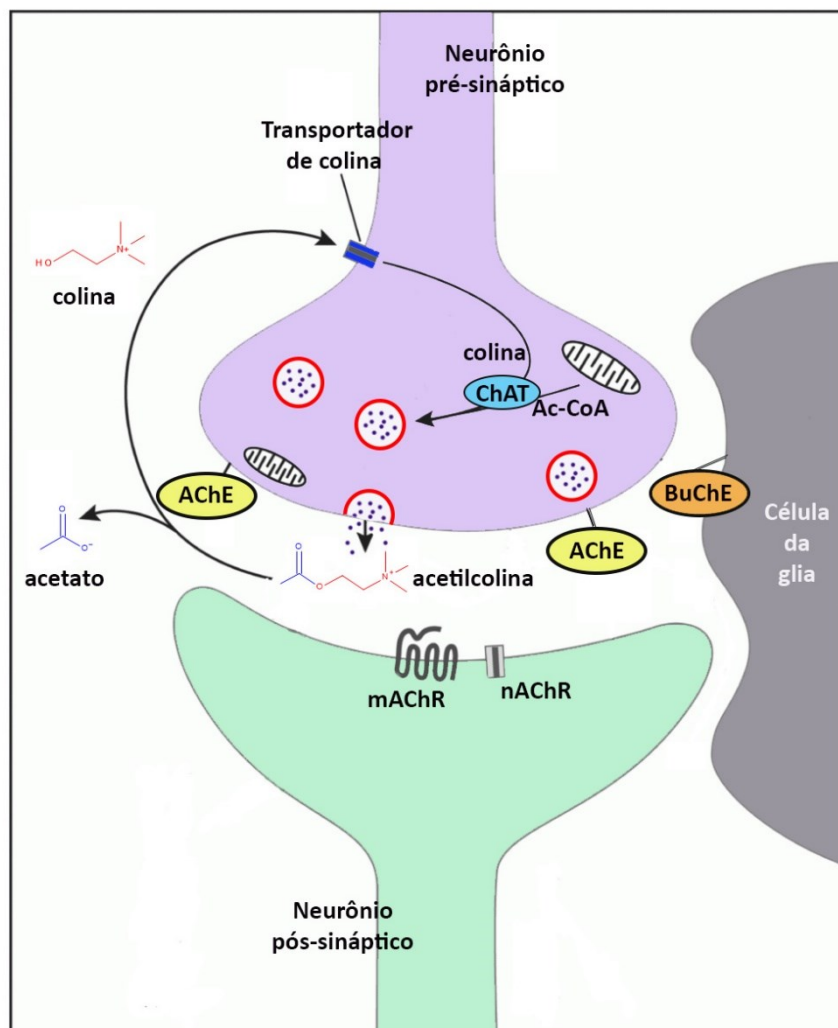
Através de estudos *post-mortem* em pacientes acometidos pela DA, foi demonstrada a perda de circuitos neuronais colinérgicos, que poderiam estar associados ao declínio cognitivo promovido por esta doença (SCHLIEBS; ARENDT, 2006). Tais achados contribuíram para a hipótese colinérgica da DA, direcionando a busca por tratamentos através de compostos com a capacidade de estimular essas vias. Dessa maneira, nos últimos anos, fármacos inibidores de acetilcolinesterase (AChEI), foram usados com o intuito de retardar o aparecimento ou, ao menos, o agravamento do déficit cognitivo gerado pela doença (MARY et al., 1998; SAHIN et al., 2019). Na figura 2 são apresentados os AChEI aprovados na clínica para o tratamento da DA, dentre estes, apenas a tacrina teve o uso descontinuado por conta dos pronunciados efeitos adversos e de sua hepatotoxicidade (SHARMA, 2019).

Figura 2 – AChEI utilizados na clínica

Fonte: COLOVIC et al., 2013; SHARMA, 2019.

A AChE é a principal enzima responsável pela hidrólise da ACh no SNC, levando à produção de ácido acético e colina. Essa reação é um evento rápido, que leva pouco tempo para terminar, depois da liberação da ACh na fenda sináptica. A colina é então transportada de volta ao neurônio pré-sináptico, sendo reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh. Através da ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), a ACh é produzida pela reação entre colina e acetilcoenzima A (Figura 3) (MASSOULIÉ et al., 1993; SUSSMAN; SILMAN, 1992). Função semelhante é exercida pela enzima butirilcolinesterase (BuChE). Porém, enquanto a AChE é uma enzima presente na fenda sináptica (e portanto abundante na junção neuromuscular (JNM) e no sistema nervoso), a BuChE é expressa principalmente no fígado e no plasma, além de ser encontrada em células gliais (DIAMANT et al., 2006; SAXENA et al., 1999; SUSSMAN; SILMAN, 1992).

Figura 3 – Síntese e hidrólise de ACh pelas enzimas ChAT e AChE, respectivamente.



Fonte: HAMPEL et al., 2018.

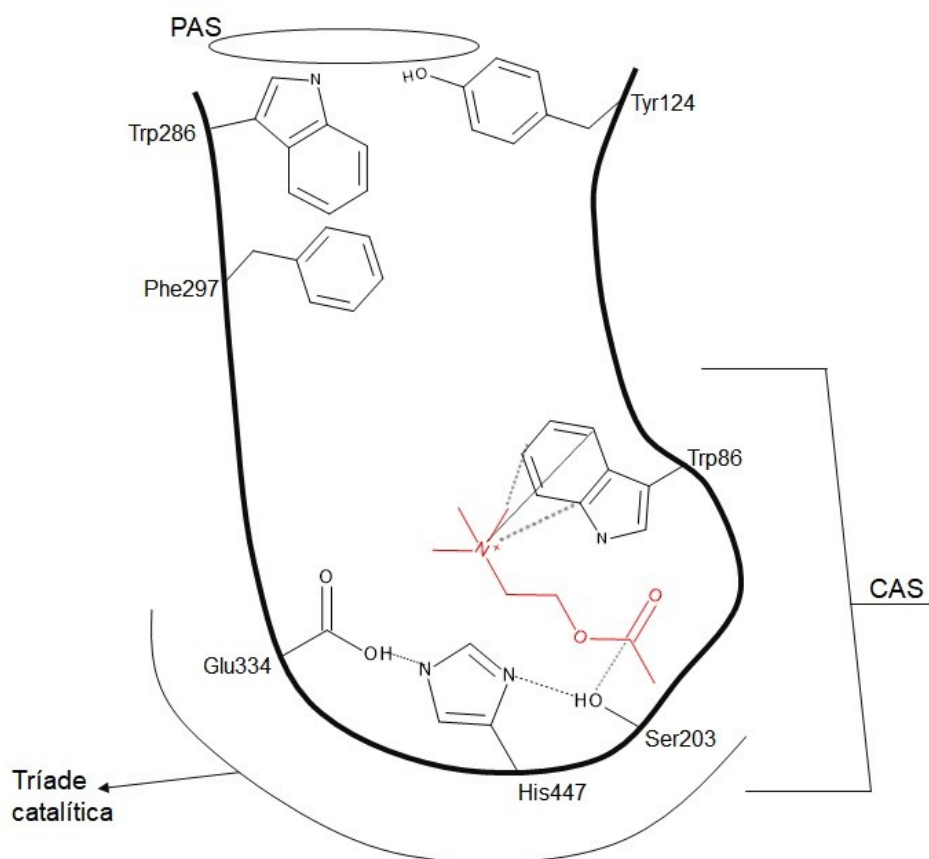
A ACh é sintetizada no interior do neurônio, por meio da enzima ChAT que catalisa a reação entre colina e acetilcoenzima A (Ac-CoA). Em seguida, a ACh é armazenada em vesículas para posterior liberação na fenda sináptica, onde pode ser hidrolisada pela ação da AChE, presente no neurônio, ou BuChE, presente em células da glia. Após a hidrólise, a colina produzida é transportada de volta ao neurônio pré-sináptico, podendo ser reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh.

A inibição da AChE leva, portanto, ao aumento do tempo de meia-vida da acetilcolina e consequentemente de seus níveis esperados, ficando mais disponível para realizar sua atividade. Fazendo dessa enzima um alvo recorrente para diversos estudos ao longo dos anos, muito importantes para entender seus aspectos moleculares e estruturais que foram utilizados no desenvolvimento de possíveis ligantes. Esses estudos foram facilitados pelo uso de colinesterases presentes em peixes elétricos, como *Electrophorus electricus* (EeAChE) e

Torpedo californica, bastante semelhantes às enzimas presentes em neurônios e na JNM de vertebrados (ATACK et al., 1987; BON; VIGNY; MASSOULIE, 1979). A homologia entre a *EeAChE* e a enzima humana é cerca de 88%, o que torna este modelo muito utilizado para estudos de novos inibidores (LIU et al., 2017).

Tais estudos permitiram elucidar a estrutura do sítio ativo da enzima, determinando possíveis pontos de interação com resíduos aminoácidos específicos. Dessa maneira, foi descoberto que a AChE possui um sítio ativo profundo, dividido em duas subunidades importantes, o sítio catalítico (CAS) e o sítio aniônico periférico (PAS) conectados por um canal (*gorge*) (COLOVIC et al., 2013; DANIEL, 1987; ORDENTLICH et al., 1993). O CAS é formado pela tríade catalítica responsável pela atividade hidrolítica da enzima, sendo composta pelos aminoácidos Ser203, His447 e Glu334 (numeração da AChE humana) e por uma região denominada subsítio aniônico, onde a presença do aminoácido Trp86 (Figura 4) contribui para a estabilização da molécula de ACh. Anteriormente acreditava-se que essa interação entre enzima e substrato fosse realizada por ligações eletrostáticas, entre o amônio quaternário e aminoácidos carregados negativamente, o que deu o nome a essa região, no entanto, hoje sabe-se que essa conexão é realizada através de interações cátion- π (AGATONOVIC-KUSTRIN; KETTLE; MORTON, 2018; LIU et al., 2017).

Figura 4 – Representação do CAS e PAS da AChE, com os principais aminoácidos envolvidos em interações com o substrato e com ligantes.



Fonte: BUTINI et al., 2008; ISMAILI et al., 2017; LIU et al., 2017.

O PAS (Figura 4), por sua vez, está localizado ao redor da abertura do sítio ativo, com a função de auxiliar a catálise enzimática através de uma interação inicial com a ACh, guiando-a para o interior da unidade hidrolítica propriamente dita. Estudos de cinética indicaram que esta conexão é um passo importante para que o processo enzimático ocorra da forma rápida como é reconhecido (HAREL et al., 2008; JOHNSON; MOORE, 2005; SUSSMAN; SILMAN, 1992). Apesar do nome indicar um caráter aniônico para essa região, assim como o subsítio interno homônimo, a interação com a ACh é classificada como cátion- π , entre a amina quaternária e resíduos aromáticos presentes no local. Os principais aminoácidos responsáveis por esse contato são Tyr124, Trp286, Phe295, Arg296 e Phe297. Além da enzima também contar com a presença de outros resíduos aromáticos dispostos aproximadamente no meio do *gorge*, como Tyr72, Phe338 e Tyr341 que, em conjunto com aminoácidos Ser125 e Asp74,

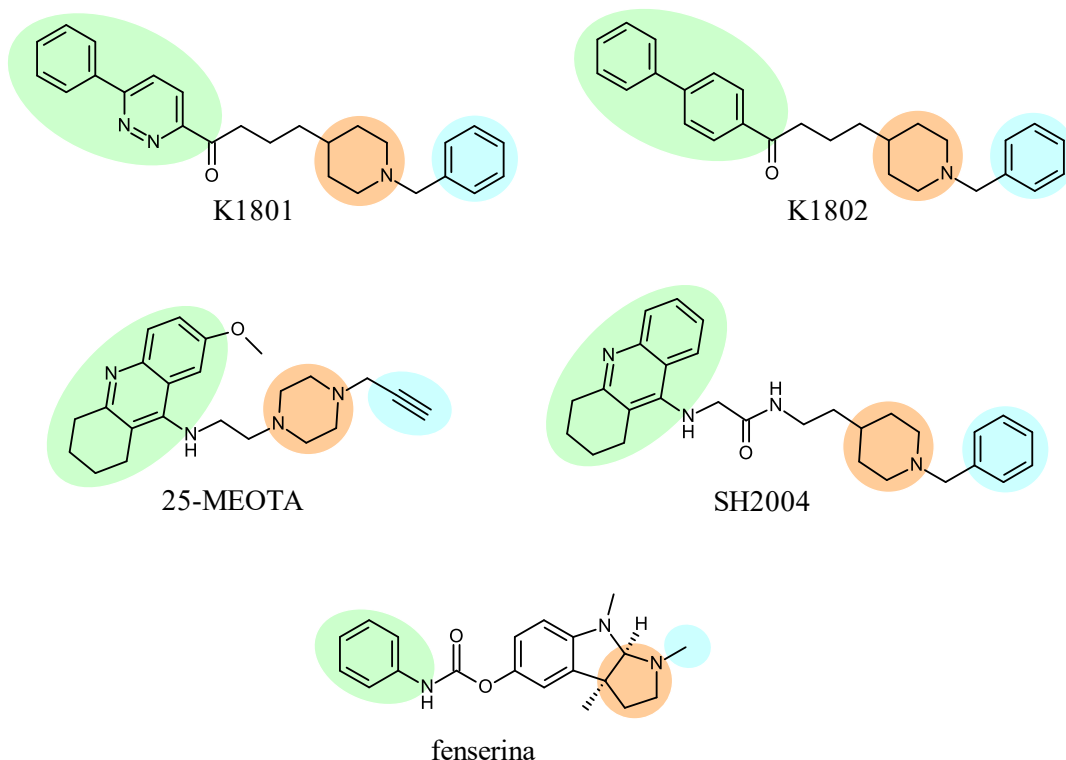
forneem pontos de considerável importância na interação com ligantes (BUTINI et al., 2008; ISMAILI et al., 2017).

O PAS não é exclusivo da AChE, presente também na enzima BuChE e exercendo função semelhante (BAJDA et al., 2011; DVIR et al., 2010). Estruturalmente as duas isoformas são similares, com cerca de 50 a 60% de homologia. Pequenas diferenças entre ambas podem ser expressas em diferenças na especificidade pelo substrato e na interação com ligantes (LANE; POTKIN; ENZ, 2006). Assim, a exemplo da donepezila (Figura 2), a maioria dos atuais agentes anticolinestásicos aprovados para uso são mais seletivos para AChE, característica que pode ser benéfica, visto que a presença mais acentuada da BuChE fora do SNC poderia levar a efeitos indesejáveis periféricos no caso de sua inibição (COLOVIC et al., 2013; DARREH-SHORI, 2009).

Porém, descobertas recentes relacionadas à DA e ao uso de AChEI revelaram que, com o progresso da doença, os níveis centrais de AChE diminuem, enquanto ocorre um pronunciado aumento na atividade butirilcolinesterásica (SETSHEDI, 2019; VITALE et al., 2018). No mesmo contexto, ensaios *in vitro* demonstraram que o PAS presente na AChE contribui para a agregação de peptídeos β -amilóides, favorecendo a formação das placas senis, apontadas como uma das causas do declínio cognitivo presente na DA (INESTROSA et al., 1996).

Esses achados têm levado ao planejamento de moléculas com a capacidade de inibir as duas isoformas, além de possuírem características estruturais que permitam a interação com ambos os sítios acetilcolinesterásicos, o CAS e o PAS. Tais compostos, como o K1801 e o K1802 desenvolvidos por KILIC et al. (Figura 5), podem fornecer benefícios adicionais no tratamento da DA, por agirem tanto no início da doença, quanto em seus estágios mais avançados (KILIC et al., 2018). O composto fenserina (Figura 5), por sua vez, além da capacidade em atuar como AChEI, demonstrou reduzir os níveis da proteína precursora amiloide e de peptídeos β -amilóides, efeitos observados tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (TEICH et al., 2018).

Figura 5 - Inibidores das colinesterases



Fonte: KILIC et al., 2018; MISHRA; KUMAR; PANDA, 2019.

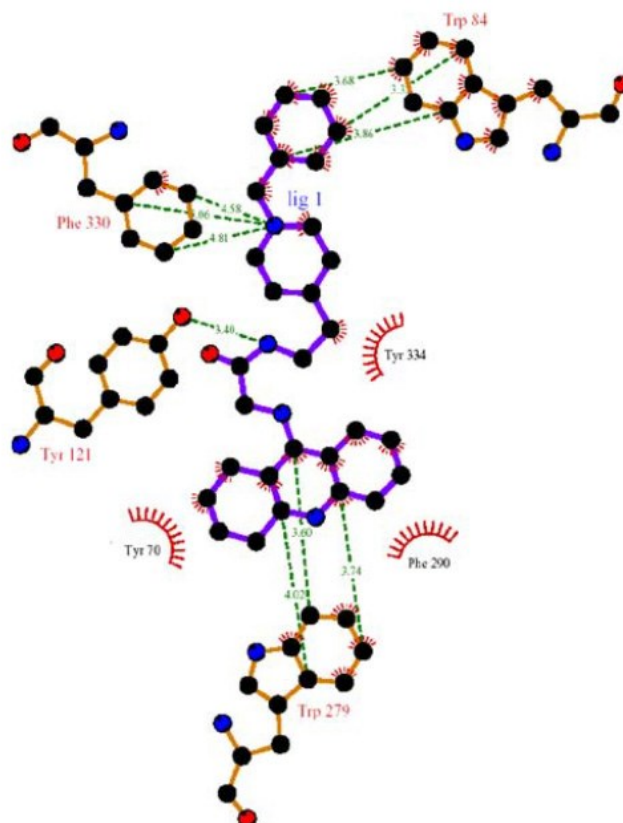
Outros exemplos que podem ser destacados são os híbridos tacrina-donepezila 25-MEOTA e SH2004 (Figura 5) que, através de estudos de ancoragem molecular também demonstraram interagir com os dois sítios enzimáticos (Figura 6). A conexão da porção tacrina nesses compostos ainda colaborou para a perda de seletividade frente às colinesterases, com inibição tanto de AChE quanto de BuChE (KORABECNY et al., 2014; SHAO et al., 2004).

A figura 6 demonstra o perfil de ancoragem do composto SH2004 em AChE de *Torpedo californica*. Nesse estudo é importante ressaltar as principais interações realizadas entre o ligante e a enzima, que ocorrem de maneira semelhante às interações entre enzima e substrato destacadas anteriormente. No caso da acetilcolina, sua estabilização ocorre por conta das relações estabelecidas com elétrons π desemparelhados, tanto no CAS, quanto no PAS, principalmente pela presença de aminoácidos Trp (BUTINI et al., 2008; ISMAILI et al., 2017; LIU et al., 2017).

De forma análoga, podem ser observadas interações das regiões aromáticas do composto SH2004 com resíduos aromáticos de Trp84 e Trp279, presentes no CAS e PAS,

respectivamente (neste caso os números se referem à AChE de *Torpedo californica*). Somado a essas interações, o composto ainda é capaz de estabelecer conexões através de ligações de hidrogênio e cátion- π , importantes para sua estabilização dentro da enzima (SHAO et al., 2004).

Figura 6 – Estudo de ancoragem molecular do composto SH2004 em AChE de *Torpedo californica*



Fonte: SHAO et al., 2004. Reproduzido com permissão da Elsevier.

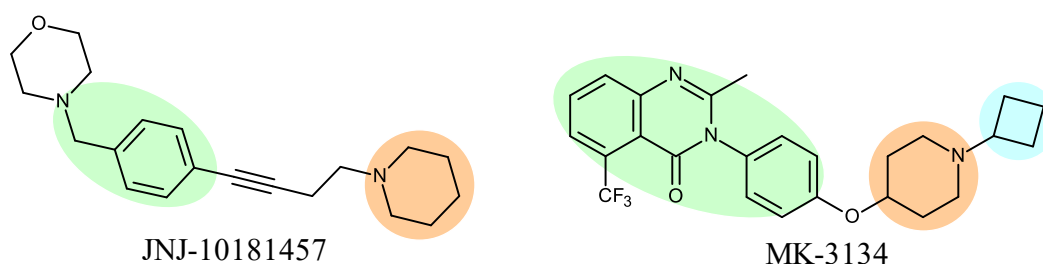
Esse perfil mais amplo de atuação tem demonstrado muitos benefícios na busca por novos tratamentos para a DA e outras condições clínicas, que igualmente envolvem prejuízos aos processos de aprendizado e memória. Favorecendo, além da ampliação do escopo de atuação dentro do sistema colinérgico, que uma terapia multialvo seja considerada (JANKOWSKA et al., 2017).

Dentro desse contexto, resultados promissores têm sido obtidos através da associação de compostos capazes de atuar nas vias histaminérgicas e colinérgicas. Estudos *in vivo* indicaram que o composto JNJ-10181457 (Figura 7), um antagonista de H_3R , é capaz de aumentar os níveis corticais de ACh e noradrenalina. Ensaios comportamentais realizados em modelos murinos demonstraram que este composto, associado à donepezila, promoveu

melhoria significativa na retenção da memória quando comparado ao uso de ambos isoladamente (GALICI et al., 2009).

Efeitos semelhantes foram vistos em ensaios clínicos utilizando MK-3134 (Figura 7), outro antagonista H_3R que, também em associação com a donepezila, foi capaz de reverter o déficit cognitivo promovido por escopolamina, revelando efeitos melhores do que cada composto separadamente (CHO et al., 2011; ŁAŻEWSKA et al., 2016). Assim acredita-se que ligantes com ação dupla inibidora H_3R /AChE sejam úteis no tratamento de distúrbios que resultem em dificuldade de aprendizado e declínio na formação e recuperação da memória (INCERTI et al., 2010; JOŃCZYK et al., 2019).

Figura 7 – Antagonistas H_3R com potencial atividade pró-cognitiva



Fonte: GALICI et al., 2009; ŁAŻEWSKA et al., 2016.

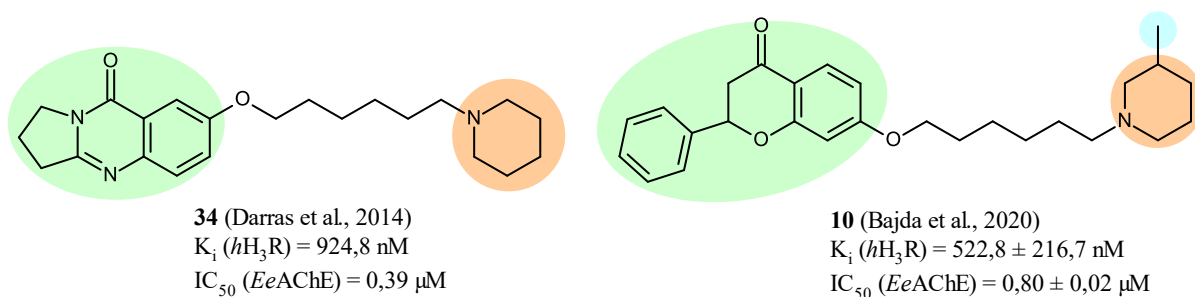
1.3 Considerações relevantes para o planejamento dos compostos

O atual tratamento de doenças complexas se baseia no uso de mais de um medicamento, na tentativa de fornecer a terapia mais abrangente e, portanto, mais eficaz. No entanto, essa abordagem, conhecida como polifarmácia, traz inúmeros problemas, como por exemplo incompatibilidades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Somado a isso existe o fato de que muitas doenças multifatoriais são potencialmente crônicas, levando à necessidade de uso desta polifarmácia por longos períodos, o que prejudica a adesão aos tratamentos (BUCCAFUSCO; TERRY, 2000; ULIASSI et al., 2017; UNZETA et al., 2016).

Diante disso, o uso de compostos multialvo permite evitar possíveis riscos de interações medicamentosas, que eventualmente levariam à toxicidade. Ainda, o uso de um único medicamento no lugar da polifarmácia reduz a possibilidade de falhas na adesão. Em vista desses benefícios, muitos compostos têm sido planejados e avaliados quanto à potencial atividade múltipla como AChEI e antagonistas/agonistas inversos de H_3R (KOLA; LANDIS, 2004; RODRÍGUEZ-SOACHA; SCHEINER; DECKER, 2019).

Dentro desta abordagem vários exemplos são encontrados na literatura, podendo ser citados os trabalhos de Bajda et al. (2020) e Darras et al. (2014) (Figura 8), que desenvolveram séries de compostos com pequenas variações estruturais a fim de identificar pontos importantes de interação com os alvos de interesse (BAJDA et al., 2020; DARRAS et al., 2014).

Figura 8 - Agentes com característica de ação multialvo, combinando atividade anticolinesterásica e antagonista H_3R



Fonte: BAJDA et al., 2020; DARRAS et al., 2014.

Com base nas estruturas multialvo destacadas (Figura 8), bem como na comparação destas com os compostos de atividade específica inibidora de AChE e antagonista H_3R , é possível tanto destacar uma estrutura base, quanto inferir algumas das características estruturais com as melhores atividades biológicas. Primeiramente, a partir da análise destes compostos, pode-se verificar que ligantes do receptor H_3R (Figuras 1 e 7) apresentam um núcleo (hetero)aromático (destacado em verde) distante 2-4 átomos de um grupo básico ionizável em pH fisiológico (laranja), e muitos deles apresentam um átomo polar (principalmente O) neste grupo espaçante. Paralelamente, inibidores de AChE (Figura 5) possuem características semelhantes: núcleo (hetero)aromático (verde) e um grupo básico (laranja), separados por um espaçante. Nestes últimos, substituintes no grupo ionizável podem ser observados, como por exemplo o grupamento benzila (azul) na donepezila (Figura 2), ou nos compostos destacados na Figura 5.

Estas características estruturais também estão presentes na maioria dos compostos multialvo apresentados (Figura 8), num clássico exemplo de sobreposição de farmacóforos. No entanto, a análise destes últimos demonstra a importância de alterações mais específicas, como a variação na extensão da cadeia alquílica espaçante, posicionando as regiões aromática e básica de maneira a interagir nos dois sítios CAS e PAS da enzima, aumentando sua afinidade (GHAMARI et al., 2020; JOŃCZYK et al., 2019; PETROIANU et al., 2006).

Juntas, essas propriedades podem ser úteis no desenvolvimento de ligantes duplos eficazes, levando-se em consideração estruturas com resultados de atividades conhecidos em que, através da estratégia *scaffold hopping*, um modelo pode ser seguido com base na premissa de que ao manter os atributos essenciais de tal estrutura, atividade biológica semelhante possa ser encontrada (BÖHM; FLOHR; STAHL, 2004; HU; STUMPFE; BAJORATH, 2017).

2 OBJETIVOS

Diante da carência de terapias eficazes para o tratamento de distúrbios cognitivos, o objetivo deste trabalho foi planejar, sintetizar e avaliar compostos aril-alkilpiperazínicos com potencial atividade anticolinesterásica. Esses compostos foram preparados através de reações orgânicas convencionais e relativamente simples, e avaliados quanto ao potencial de inibir a atividade da *EeAChE*. Com os resultados obtidos, pretende-se dar continuidade para obter dados de REA que permitam otimizar o planejamento de novos compostos com atividade superior.

Especificamente, os objetivos deste trabalho foram:

- Sintetizar os compostos planejados com rendimento apropriado para os ensaios enzimáticos;
- Caracterizar as estruturas obtidas através das técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H - 300 MHz) e carbono (^{13}C - 75 MHz);
- Avaliar a atividade inibitória da *EeAChE* desses compostos utilizando a metodologia de Ellman.

3 METODOLOGIA

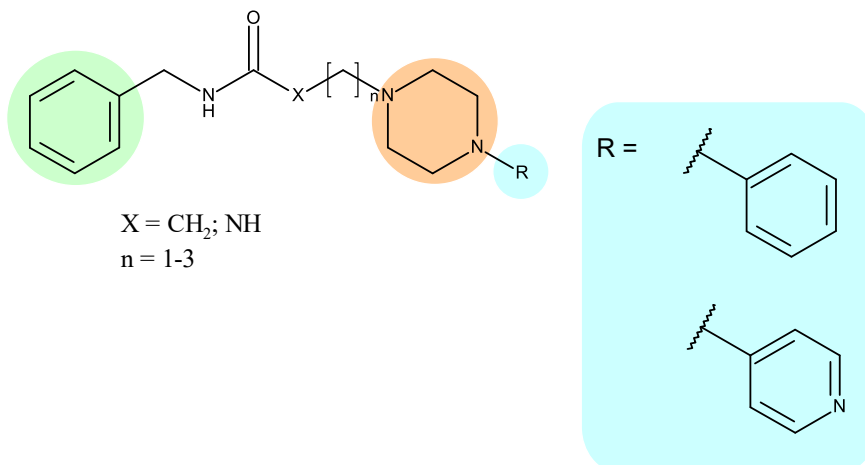
3.1 Planejamento dos compostos

Com base nas características farmacofóricas de ligantes de receptores histaminérgicos e inibidores de AChE de interesse, é possível verificar características em comum a esses compostos que podem ser utilizadas para o planejamento de compostos com potencial atividade multialvo.

Explorando as semelhanças observadas entre as duas classes de ligantes, uma série de compostos foi planejada (Figura 9), dentro da proposta de atividade multialvo. Essas estruturas apresentam o núcleo aromático (verde), distante de 5 a 7 átomos de uma região básica piperazínica (laranja) substituída pelos grupos fenila ou 4-piridila (azul). Assim, além da atividade anticolinesterásica, é possível que os compostos planejados também tenham boa afinidade por receptores de histamina H_3R .

Além disso, foram priorizadas moléculas com rota sintética simples e de baixo custo, que pudessem gerar rendimentos aceitáveis.

Figura 9 - Compostos planejados com potencial afinidade por H_3R /AChE



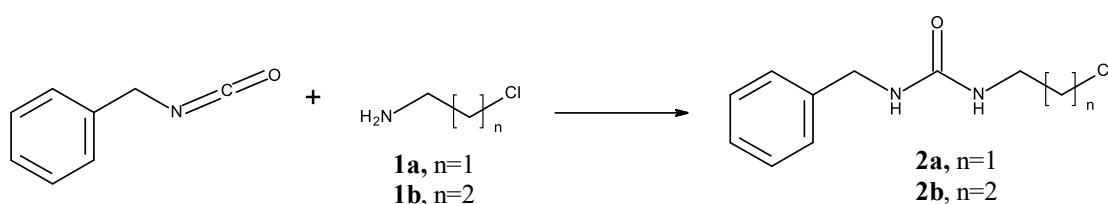
3.2 Preparação dos compostos

Os reagentes e materiais químicos foram adquiridos comercialmente de empresas especializadas com grau de pureza adequado à síntese. As reações para a preparação dos compostos foram realizadas no Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos (LINS) da UNIFESP, utilizando vidrarias e equipamentos comuns de laboratório de síntese orgânica e medicinal.

3.2.1 Síntese das ureídas

As ureias intermediárias foram preparadas através da reação do isocianato de benzila com a cloro-alkilamina correspondente, ambos comercialmente obtidos, na presença de trietilamina (TEA), em solvente aprótico (Esquema 1).

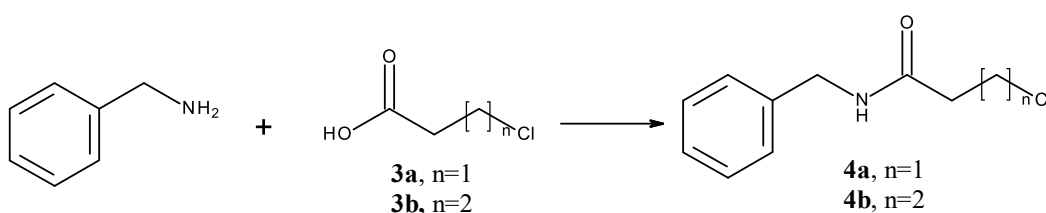
Esquema 1 - Procedimento sintético para as ureídas intermediárias (**2**). Reagentes e condições: isocianato de benzila, 2-cloro-1-etilamina (**1a**) ou 3-cloro-1-propilamina (**1b**, 1 eq.), trietilamina (TEA, 1 eq.), diclorometano (DCM, 10 mL), *t.a.*, 1-2 h.



3.2.2 Síntese das benzilamidas

As amidas intermediárias foram preparadas partindo do ácido carboxílico correspondente (**3**), que após ativação por um período de 1 a 2 horas por cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC.HCl) e pelo hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt.xH₂O), reagiram com a benzilamina em solvente aprótico (Esquema 2).

Esquema 2 - Procedimento sintético para as amidas intermediárias (**4**). Reagentes e condições: benzilamina (1 eq.), EDC.HCl (1 eq.), HOBt.H₂O (1 eq.), DCM, *t.a.*, 1 h; ácido 3-cloro-propiónico (**3a**) ou ácido 4-cloro-butírico (**3b**) *t.a.*, 18-24 h.

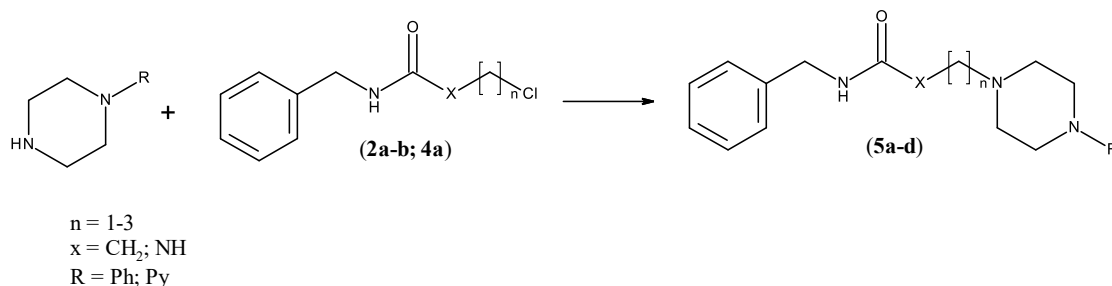


3.2.3 Síntese dos compostos finais 5a-d

Os compostos finais foram preparados através da reação de substituição nucleofílica das ureídas ou amidas intermediárias (**2a**, **2b**, **4a**), preparadas nas etapas anteriores, com a piperazina *N*-substituída (fenil ou 4-piridil) adquirida comercialmente, na presença de carbonato e iodeto de potássio (Esquema 3).

Estes, por sua vez, foram convertidos aos sais maleato correspondentes para melhorar a solubilidade em água e aumentar o grau de pureza. Para isso, os produtos foram submetidos à neutralização com excesso de ácido maléico, previamente dissolvido em solvente orgânico, e com sal formado isolado por filtração.

Esquema 3 - Procedimento sintético para os compostos finais (**5**). Reagentes e condições: piperazina *N*-substituída (2 eq.), K₂CO₃ (1 eq.), KI (1 eq.), acetonitrila, refluxo, 60-70 °C, 24 h.



3.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando a acetilcolinesterase de enguia (*Electrophorus electricus*, EeAChE), seguindo metodologia de Ellman adaptada (MATHEW; SUBRAMANIAN, 2014). O iodeto de acetiltiocolina (ASChI) foi utilizado como substrato, em concentração de 15 mM. Os compostos finais foram testados em ensaio *endpoint* nas concentrações de 1 µM e 100 µM. A enzima foi utilizada na concentração de 1 U/mL e o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) na concentração de 3 mM. A donepezila (inibidor da AChE) foi utilizada como padrão farmacológico, na concentração de 1 µM. E um controle com o solvente de diluição dos compostos, DMSO, foi usado como controle negativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

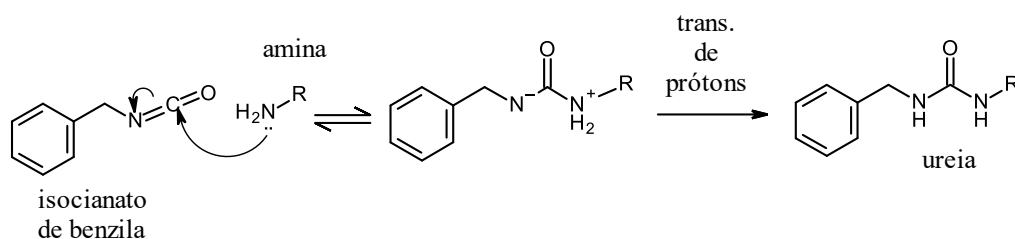
4.1 Preparação dos compostos

4.1.1 Síntese das ureídas

Inicialmente, as ureias eram sintetizadas através da reação de aminas substituídas com fosgênio, por conta da elevada reatividade deste composto e de seu baixo custo. No entanto, o fosgênio se mostrou como um reagente bastante tóxico, por conta da alta liberação de subprodutos clorados, tóxicos ao ambiente e instáveis quando armazenados em grandes quantidades. Esta limitação, principalmente no meio industrial, favoreceu o desenvolvimento de outras rotas sintéticas para a produção de ureias (BIGI; MAGGI; SARTORI, 2000; NEVILLE; MCGEE, 1973; NITSCHKE; SCHERR, 2012).

Uma das rotas utilizadas atualmente é feita através da reação de adição nucleofílica entre uma amina primária ou secundária e o isocianato, pela facilidade de realização e relativa menor toxicidade (Figura 10) (KURZER, 1963). Historicamente, o próprio isocianato era produzido através de fosgênio, porém, várias tentativas de otimizar sua síntese e torná-la mais verde, trouxe métodos menos tóxicos ao ambiente (ARNOLD; NELSON; VERBANC, 1957; CARNAROGLIO et al., 2013). Dessa forma, a síntese de ureias através da reação entre o isocianato e aminas substituídas tem se mostrado uma opção bastante viável, levando-se em consideração as condições reacionais brandas, em períodos curtos de tempo e que levam a bons rendimentos, de 50 % até valores quantitativos (KUZNETSOV et al., 2016; MERLOS et al., 1990).

Figura 10 – Mecanismo geral da síntese das benzilureias.



Fonte: KURZER, 1963.

A este respeito, pode-se avaliar como bastante satisfatórios os rendimentos obtidos para a síntese das ureias propostas neste trabalho, de 88 % e 79 %, para os compostos **2a** e **2b**, respectivamente. É válido destacar a importância de se manter uma relação estequiométrica entre os reagentes utilizados, por conta da alta reatividade de ambos. No caso do isocianato, a presença de suas duas duplas ligações permite estruturas de ressonância que funcionam tanto

como doadores de elétrons, como aceptores, tornando este composto capaz de reagir consigo mesmo, com o auxílio de uma amina terciária básica, formando estruturas cíclicas como uretidiona e anéis de isocianurato, prejudicando a reação desejada com a alquilamina empregada (JANIK; SIENKIEWICZ; KUCINSKA-LIPKA, 2014; KREYE; MUTLU; MEIER, 2013).

À semelhança do isocianato, as alquilaminas utilizadas neste trabalho também possuem a capacidade de reagir entre si, visto que a presença da função haleto da alquila, conhecida como um bom grupo de partida em reações de substituição nucleofílica, aliado à presença das aminas primárias, reconhecidas como bons nucleófilos devido à sua basicidade, poderia levar à formação de aminas dialquiladas (ANDERSON; SU; WATSON, 1969; MAYR; PATZ, 1994). Tais interações, de ambos os reagentes, poderiam levar a perdas de rendimento, prejudicando as etapas de síntese subsequentes.

4.1.2 Síntese das benzilamidas

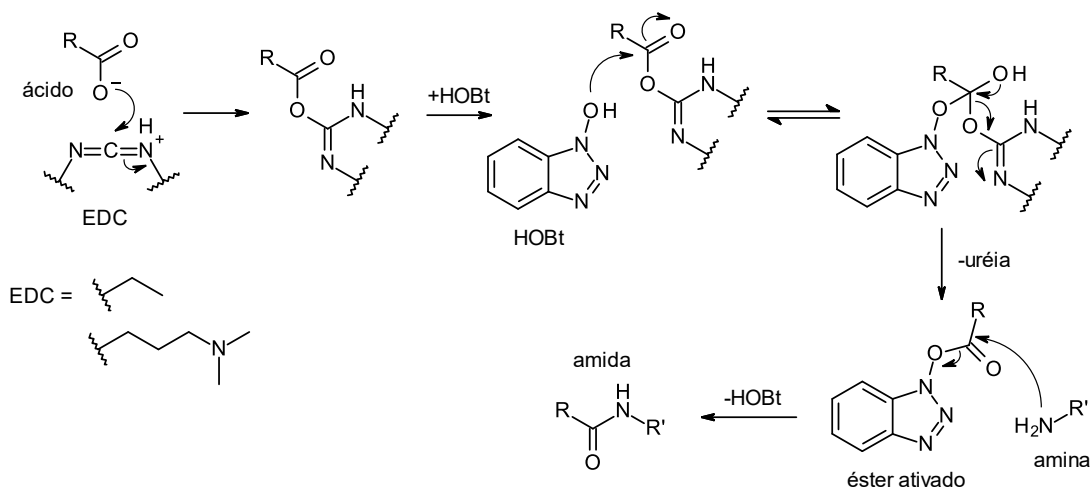
As amidas são funções orgânicas derivadas de reações com ácidos carboxílicos, através de uma sequência de etapas de adição-eliminação utilizando aminas. Porém, a característica básica das aminas pode promover uma reação ácido-base, levando à formação de um composto resistente ao ataque nucleofílico, o íon carboxilato (SAMPATHKUMAR; KUMAR; RAJENDRAN, 2004; VOLLHARDT; SCHORE, 2013). Dessa maneira, algumas alternativas podem ser empregadas, permitindo a formação de amidas em condições mais brandas do que as necessárias para reverter a formação deste sal. Dentre as alternativas disponíveis, uma das principais usadas para vencer a limitação termodinâmica dessa reação é o uso de cloretos de acila. Outros métodos menos comuns, por serem menos reativos e relativamente mais caros ou trabalhosos, são a transamidação ou a ativação do ácido através da formação de anidridos ou ésteres (KOLYMPADI MARKOVIĆ; MARKOVIĆ; LACLEF, 2020; SRINIVASAN; MANISANKAR, 2010).

Entretanto, apesar de comum, o uso de cloretos de acila está relacionado à alguns problemas, como a reatividade à água, que pode hidrolisar o reagente ao ácido carboxílico correspondente, além da formação de ácido clorídrico (HCl) durante o processo de síntese, tornando necessária a adição de uma base não reativa, para sua neutralização (MONTALBETTI; FALQUE, 2005; RAYLE; FELLMETH, 1999). Somado a isso, considerando que o reagente utilizado neste trabalho também tem a função haleto de alquila, o

uso de uma base pode também propiciar a reação de substituição nucleofílica com a amina, o que acarretaria no aumento da complexidade do produto obtido no final.

Devido a essas desvantagens, a síntese de amidas é comumente realizada através do tratamento inicial do ácido carboxílico com carbodiimidas, formando um intermediário ativo capaz de reagir *in situ* com a amina de interesse, em condições brandas. Em combinação com as carbodiimidas são utilizados reagentes que permitem que a reatividade do intermediário ativo se mantenha, evitando reações colaterais (YANG, 2015). Na síntese das benzilamidas deste trabalho, o reagente utilizado com esta finalidade foi o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), combinado então com a carbodiimida *N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (HAIDUKEVICH et al., 2020; HO et al., 1995). O HOBt leva a formação de ésteres ativados, que podem ser facilmente atacados pelo grupo amino livre, com posterior regeneração do HOBt e formação da amida (Figura 11) (COSTA, 2014). Esta associação é frequentemente reportada na literatura, por conduzir a bons rendimentos, além da formação de subprodutos de fácil eliminação, menos reativos quando comparados aos provenientes de amidações a partir de haletos de acila, por exemplo (COSTA, 2014; HAIDUKEVICH et al., 2020).

Figura 11 – Mecanismo geral da síntese das amidas com a associação de EDC e HOBt.



Fonte: YANG, 2015.

Outras carbodiimidas podem ser aplicadas com o mesmo propósito, porém com certas limitações. A *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), por exemplo, produz um subproduto derivado de sua reação com o ácido carboxílico, a *N,N'*-dicicloexilureia, que é insolúvel em água mas parcialmente solúvel em solventes orgânicos, podendo persistir como contaminantes do produto desejado mesmo após várias filtrações (TANG; MOHAN; VERKADE, 1994). Assim, sua preferência por solventes orgânicos frequentemente dificulta a purificação de

compostos com a mesma característica de solubilidade, como no caso das benzilamidas sintetizadas neste trabalho. De maneira diferente, a EDC leva à formação de subprodutos solúveis em água, e, portanto, mais facilmente removidos por meio de extrações líquido-líquido nas quais as diferenças de solubilidade entre o subproduto e o composto de interesse permitem sua separação. Isso possibilita melhores rendimentos que no caso anterior, e a obtenção de um produto com maior pureza (MADISON; CARNALI, 2013).

A esse respeito, ao comparar os rendimentos obtidos de reações de amidação disponíveis na literatura, com rotas sintéticas semelhantes à utilizada neste trabalho, é possível observar uma ampla faixa de rendimentos adquiridos, os quais podem variar de 14% a 85%, a depender de fatores como os materiais de partida utilizados, a carbodiimida e seu uso em associação com HOBt ou não (GHOSH; SHAHABI, 2020; KILIC et al., 2018; SANO et al., 2006; VOLONTERIO; ZANDA, 2008). Dessa forma, os rendimentos de 48% e 39% referentes aos compostos **4a** e **4b**, respectivamente, podem ser considerados satisfatórios.

Houve ainda a tentativa de realizar a purificação dos compostos através de métodos cromatográficos, no entanto, este culminou com maiores perdas de rendimento, como no caso do composto **4b**, que foi reduzido para menos de 24 %. Considerando a manutenção de pureza suficiente para a realização dos procedimentos sintéticos subsequentes com a aplicação de técnicas de extração líquido-líquido, com rendimentos superiores, este método foi o principal utilizado neste caso. Vale ressaltar que não há relatos na literatura da síntese dos compostos propostos, permitindo inferir que os mesmos são inéditos. Este fator, aliado à facilidade do processo sintético, em que condições brandas são utilizadas, permitem que seja feita uma avaliação positiva da síntese de tais intermediários.

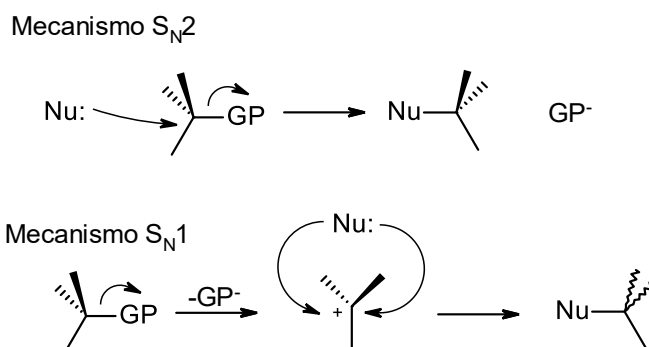
4.1.3 Síntese dos compostos finais

Para a preparação dos compostos finais foi realizada uma reação de substituição nucleofílica entre os compostos intermediários, ureídas e benzilamidas (**2a-b** e **4a-b**, respectivamente), e a 1-fenilpiperazina ou 1-(4-piridil)piperazina. Este tipo de reação é frequentemente reportado na literatura, ocorrendo, de maneira geral, através da substituição de um grupo de partida (GP) por uma base de Lewis (nucleófilo) em um substrato (WANG et al., 2016; WYKES; MACNEIL, 2007).

De acordo com seu perfil cinético, o mecanismo dessa reação pode ser classificado de duas formas. A primeira representa as substituições em que a velocidade da reação depende

apenas de uma espécie, o substrato, sendo denominado de substituição nucleofílica unimolecular, ou S_N1 . Já as substituições que tem sua velocidade reacional dependente tanto da concentração do substrato quanto do nucleófilo são conhecidas como substituição nucleofílica bimolecular, ou S_N2 . (ROSSI; PIERINI; PEÑÉÑORY, 2003; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018). Um esquema simplificado para cada mecanismo é demonstrado na Figura 12.

Figura 12 - Esquema representativo de uma S_N2 e S_N1 , respectivamente



Fonte: SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018; VOLLHARDT; SCHORE, 2013.

A S_N2 ocorre em uma única etapa, com um mecanismo dito concertado, ou seja, se baseia na sincronia entre o ataque nucleofílico e a saída do GP. Para que isso ocorra, o nucleófilo se conecta ao carbono do substrato pelo lado oposto ao do grupo de partida e a formação da ligação entre ele e o carbono é que fornece a maior parte da energia necessária para quebrar a ligação entre este átomo e o GP. Em contrapartida, a S_N1 ocorre em mais de uma etapa, e sua velocidade irá depender majoritariamente do primeiro processo a ocorrer que é a quebra heterolítica da ligação carbono-GP. Isso culmina com a ionização do substrato em uma espécie denominada carbocátion, com o GP formando o íon de carga negativa. Nas etapas seguintes o nucleófilo reage com este carbocátion, se conectando ao substrato (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018; VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

Por conta das peculiaridades de cada tipo de substituição nucleofílica, a preferência entre a ocorrência de uma ou de outra irá depender de alguns fatores como o tipo de nucleófilo empregado, do substrato, do GP e das condições reacionais como temperatura aplicada e solvente utilizado (ROSSI; PIERINI; PEÑÉÑORY, 2003; THANH et al., 2009). A capacidade de uma substância em realizar o ataque nucleofílico é influenciada pela sua basicidade e impedimento estérico. Desta forma, as piperazinas *N*-substituídas utilizadas neste trabalho

podem ser consideradas nucleófilos adequados, pois contém um nitrogênio não substituído de caráter básico (LIN et al., 2004; YU; COOTE, 2019).

A capacidade de uma substância em agir como nucleófilo também irá depender da estabilidade deste frente à reação com o substrato e de sua polarizabilidade. Este conceito é importante quando são comparadas diferentes espécies nucleofílicas com o mesmo átomo sendo responsável pelo ataque ao eletrófilo (BUNCEL; UM, 2004; EDWARDS; PEARSON, 1962). Como no caso proposto, tanto a 1-fenilpiperazina, quanto a 1-(4-piridil)piperazina possuem um anel aromático conectado à porção básica, de forma que a aromaticidade deste anel é capaz de contribuir para o aumento da força nucleofílica de tais compostos e, portanto, de sua reatividade (ENDERSON; SCHULTZ, 1962; KANZIAN et al., 2009; NIGST; ANTIPOVA; MAYR, 2012). De maneira análoga, para aumentar a representatividade da série de compostos propostos para este trabalho, também houve a tentativa de adicionar uma molécula de 1-metilpiperazina aos compostos intermediários descritos, no entanto, esta se mostrou menos reativa que as piperazinas *N*-substituídas citadas anteriormente, não sendo possível obter os produtos finais resultantes de reações com 1-metilpiperazina. Neste caso, otimizações da rota sintética devem ser consideradas de forma a promover a substituição nucleofílica com tal piperazina.

Além das características do nucleófilo, algumas propriedades do substrato podem facilitar um tipo de S_N , no lugar do outro, sendo uma propriedade importante o número de ramificações presentes no carbono que sofrerá a substituição. Como as reações de S_N2 ocorrem em uma única etapa, elas são favorecidas em carbonos menos substituídos, pois a presença de átomos diferentes de hidrogênios, podem gerar impedimento estérico capaz de dificultar o ataque do nucleófilo. Seguindo esta premissa, carbonos primários são mais reativos que os secundários, que, por sua vez, são mais reativos que os carbonos terciários. No entanto, a presença de mais de um átomo de carbono conectado ao átomo que sofrerá a substituição pode favorecer reações de S_N1 , isso porque, como a etapa limitante é a formação de um carbocátion, o efeito indutivo doador de densidade eletrônica promovido pela vizinhança de substituintes, reduz a carga formal positiva dessa espécie em um fenômeno conhecido como hiperconjugação (CAREY, 2011; YU; COOTE, 2019).

Assim, a lógica de ocorrência de uma S_N1 é inversa a de uma S_N2 , principalmente quando considerado o tipo de substrato. Considerando que as espécies envolvidas nas reações de substituição nucleofílica realizadas neste trabalho, um haleto de alquila primário e piperazinas *N*-substituídas como nucleófilos, pode-se prever que a cinética bimolecular será favorecida, ocorrendo provavelmente uma S_N2 .

Mesmo no caso de carbonos primários, o efeito da hiperconjugação ainda é capaz de gerar influências em uma S_N2 , sendo responsável pela reatividade do substrato ao nucleófilo. Em vista deste efeito, cadeias alquílicas mais longas, por carregarem mais átomos de carbono, geram maior efeito doador de densidade eletrônica que cadeias mais curtas, de maneira que, nestes compostos mais extensos, o carbono que sofrerá o ataque nucleofílico é menos eletrofílico que seu equivalente em compostos menores (JUG et al., 2017). A exemplo disso, ao observar os rendimentos obtidos na síntese dos diferentes compostos finais desenvolvidos neste trabalho, é possível perceber diferenças sutis, que poderiam ser atribuídas a este efeito. Nas reações realizadas com 1-fenilpiperazina, os intermediários com os espaçantes alquílicos menos extensos, apresentaram melhores rendimentos que os mais longos, de forma que os valores obtidos decresceram conforme se estendia a cadeia alquílica de etílica para propílica, na ordem **5a** > **5b** ~ **5c**, com os respectivos rendimentos 67%, 40%, 36%.

Ainda com relação aos substratos, não devem ser descartadas as características eletrônicas das diferentes funções orgânicas apresentadas, tanto as ureídas como as amidas, que também contribuíram com as diferenças de reatividade observadas. Por outro lado, ao analisar o efeito do nucleófilo, o uso da 1-(4-piridil)piperazina gerou o pior rendimento apresentado (10% para o composto **5d**). Neste caso, a perda de rendimento possivelmente se deve à polaridade deste composto final, que pode ter gerado perdas durante os processos de purificação, tanto por meio de extrações líquido-líquido, quanto do método cromatográfico empregado.

Além das propriedades do substrato e do nucleófilo, o tipo de GP também deve ser considerado, pois substituintes capazes de se desligar da molécula com certa facilidade geram influências na reatividade. Bons grupos de partida são aqueles capazes de acomodar melhor a carga negativa que carregam consigo ao deixar o substrato, e geralmente os halogênios são os principais GP formando substratos haletos de alquila. A qualidade dos GP segue a seguinte sequência inversa de eletronegatividade e direta de raio atômico, sendo $I > Br > Cl > F$ (VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

Ao mesmo tempo, para os halogênios, essa sequência também representa a nucleofilicidade, sendo o iodeto melhor nucleófilo que os outros halogênios. Nesse sentido, como tanto as ureidas quanto as benzilamidas intermediárias possuem um átomo de cloro na região alquil terminal, a adição do sal KI na reação é importante, pois favorece uma substituição do cloro presente nas amidas pelo iodo, contribuindo para a *N*-alquilação da 1-fenilpiperazina e 1-(4-piridil)piperazina. Estas condições reacionais, bem como o uso de solventes apróticos

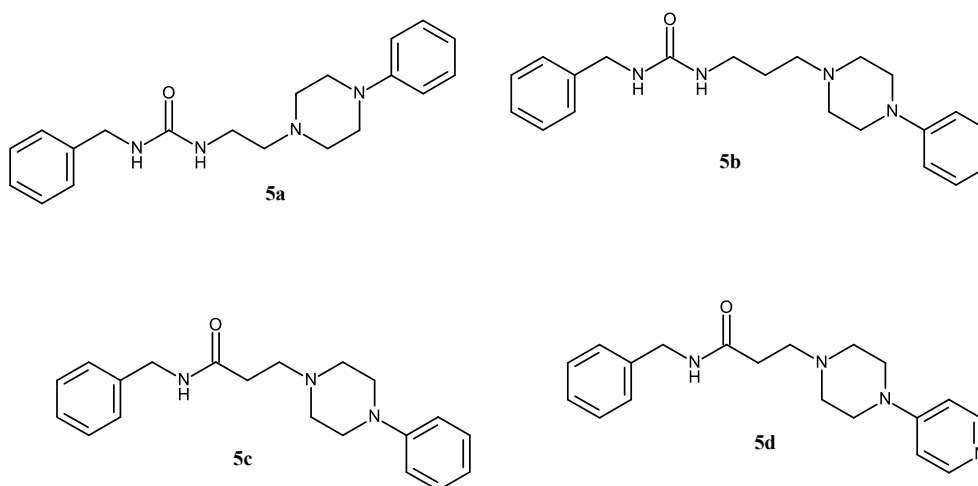
que permitem melhor reatividade do nucleófilo e costumam acelerar reações de S_N2 , por não estarem solvatados dentro do meio, colaboram para que as reações de substituição nucleofílica ocorram adequadamente (JORAPUR; JEONG; CHI, 2006; PARKER, 1962).

Vale ressaltar que buscas na literatura permitiram concluir que os compostos sintetizados para este trabalho eram inéditos até o presente relato. Entretanto, reações de substituição nucleofílica que compartilham métodos experimentais semelhantes podem ser utilizadas para comparar rendimentos. Esses relatos demonstram rendimentos dentro de uma ampla faixa (entre 45% e 76%), com diversas variações no substrato como o GP, ou ainda nas características básicas da piperazina que podem influenciar estes valores (BAJDA et al., 2018; CORRÊA et al., 2017a; CORRÊA et al., 2017b; YE et al., 2011).

4.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Os quatro compostos finais obtidos (Figura 13) foram avaliados quanto à capacidade de inibir a atividade de AChE. Para tanto, duas concentrações de cada um foram utilizadas e a porcentagem de atividade enzimática após a incubação com tais compostos foi determinada com o auxílio do programa GraphPad Prism.

Figura 13 – Compostos finais obtidos



A análise dos resultados permitiu demonstrar que todos os compostos foram capazes de inibir significativamente a atividade enzimática na concentração de 100 μM quando comparados ao controle, ou seja, à incubação da enzima com seu substrato apenas em meio tampão (Tabela 1 – **5a** $p = 0,0372$; **5b** $p = 0,0089$; **5c** $p = 0,0192$; **5d** $p = 0,0002$; donepezila p

< 0,0001). Entretanto, para as concentrações de 1 μ M de cada composto aplicado, não houve diferença estatística em relação ao controle.

Tabela 1 – Atividade da AChE medida após incubação com os compostos finais

Composto	% atividade (100 μ M, \pm EPM)	% atividade (1 μ M, \pm EPM)
5a	59,04 \pm 3,67*	81,76 \pm 14,06
5b	64,85 \pm 0,28*	110,1 \pm 7,94
5c	67,62 \pm 3,88*	111,3 \pm 8,78
5d	51,75 \pm 4,49*	112,8 \pm 1,54
Donepezila	-	4,24 \pm 2,1*

Os dados são expressos em porcentagem de atividade de hidrólise de ASChI \pm erro padrão da média (EPM). * p < 0,05 em relação ao controle.

Quando comparados entre si dentro da mesma faixa de concentração, é possível observar diferenças entre as porcentagens de inibição de cada composto, mais evidentes sob os ensaios realizados em 100 μ M que, apesar de não serem significativas estatisticamente, permitem elucidar certas características estruturais potencialmente benéficas para a atividade anticolinesterásica.

Um bom exemplo é dado pelos compostos **5c** e **5d**, nos quais a troca da 1-fenilpiperazina pela 1-(4-piridil)piperazina (Figura 13) é a única diferença estrutural entre ambos, levando à hipótese de que a troca do substituinte fenila por uma piridina, tenha sido a responsável pela melhora na atividade, ressaltando-se a propriedade básica que o substituinte piridínico possui, característica ausente no anel fenílico. Outra contribuição dada pela substituição do CH por um átomo de nitrogênio é a capacidade que este último tem em realizar interações através de ligações de hidrogênio com aminoácidos presentes na enzima, o que o átomo de carbono não é capaz de fazer. Ao analisar situações semelhantes na literatura, compostos com ambos os nitrogênios básicos em uma das extremidades têm demonstrado melhores resultados de atividade anticolinesterásica do que seus análogos estruturais, em que apenas um dos nitrogênios fornece tal característica (KILIC et al., 2018).

De acordo com estudos de ancoragem molecular, a alcalinidade dos inibidores de AChE é uma propriedade capaz de contribuir com importantes interações dentro da enzima, devido à capacidade de conexões cátion- π , através da presença de aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina em sua extensão além de aminoácidos triptofano observados na região PAS (PANG et al., 1996; ROSENBERRY et al., 2017). Com relação a esta região periférica, podem ser

levados em consideração dois potenciais benefícios, o fornecimento de pontos de contato a mais, com melhores resultados de inibição enzimática, e o bloqueio da possível atividade extra catalítica que têm sido relacionada a este sítio em particular, ao qual é atribuída a contribuição na formação de agregados da proteína β -amilóide (β A) extracelulares insolúveis (BOLOGNESI et al., 2005; MUÑOZ-RUIZ et al., 2005).

Outro fator que tem sido discutido na literatura e também pode ser observado neste conjunto de compostos avaliados é o comprimento do espaçante, que determina a distância entre a região aromática e a extremidade básica do ligante. Alguns dados indicam que o alongamento da cadeia alquílica e, portanto, maiores extensões entre uma extremidade e outra são favoráveis à atividade anticolinesterásica, no entanto, há um limite para seu comprimento, parecendo existir uma distância ótima a ser aplicada (ŁAŻEWSKA et al., 2016; WANG et al., 2019; XIE et al., 2008). Neste caso especificamente, ao analisar as estruturas **5a**, **5b** e **5c** (Figura 13), que não possuem diferença na região básica, o aumento do comprimento do intermediário alquílico de dois para três carbonos entre **5a** e **5b**, respectivamente, aparentemente reduziu a inibição enzimática. Contudo, a redução da distância geral entre as duas extremidades do ligante, de 6 átomos no composto **5a** para 5 no composto **5c**, também levou a uma leve diminuição de ação.

Neste último caso, vale ressaltar que as amidas e as ureídas são consideradas bioisósteros, carregando algumas similaridades. Dentre elas, pode ser citada a capacidade de ambas em realizar ligações de hidrogênio com aminoácidos tirosina ou moléculas de água, disponíveis ao longo da abertura do sítio ativo da AChE. No entanto, como o grupo metilênico da amida não é capaz de realizar as mesmas interações moleculares que o nitrogênio presente nas ureídas, a presença de um no lugar do outro, poderia levar a algumas modificações na atividade anticolinesterásica (BAJDA et al., 2020; DARRAS et al., 2014; HUANG et al., 2011). Porém, este efeito necessitaria ser melhor demonstrado através da atividade de compostos com o mesmo comprimento, a fim de evitar outras influências.

Apesar do caráter preliminar destes resultados, eles auxiliam na compreensão das características capazes de promover as melhores interações, guiando as modificações estruturais que podem ser realizadas. Para contribuir com esse processo, curvas concentração-resposta serão realizadas, visando obter os valores de IC_{50} dos ligantes com melhores atividades. Ressalta-se ainda, que estes compostos carregam propriedades capazes de gerar interações com receptores histaminérgicos H_3 , que futuramente deverão ser avaliadas, também norteando novas otimizações.

5 CONCLUSÕES

É possível concluir que os compostos apresentados neste trabalho foram obtidos com rendimentos satisfatórios. Pode ser atribuído a isso a rota sintética de fácil execução, bem como a originalidade dos compostos, que até o presente momento se mostraram inéditos.

A avaliação da atividade inibitória da *EeAChE* levou a porcentagens de inibição moderadas, sendo que, dentre os quatro compostos aplicados no ensaio, o melhor resultado pode ser atribuído ao composto **5d**, com 48% de atividade. Este ensaio, aliado aos conceitos utilizados no planejamento dos compostos, permitiu observar que novas otimizações deverão ser realizadas, de forma a produzir novos compostos carregando as características estruturais identificadas como mais adequadas.

6 EXPERIMENTAL

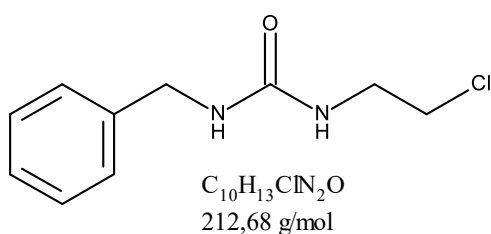
Todos os produtos obtidos foram caracterizados através de técnica espectroscópica disponível na UNIFESP, determinando sua estrutura por meio de RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz).

6.1 Síntese das ureídas

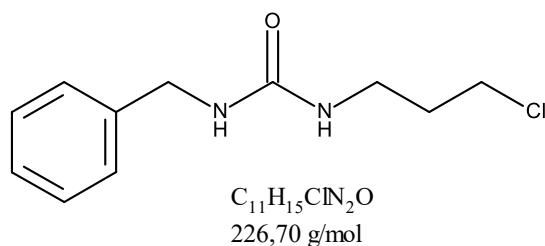
Em um balão de 25 mL, foram adicionadas quantidades equimolares (3 mmol) do isocianato de benzila (0,3994 g) e da alquilamina correspondente (**1a-b** Tabela 2), seguida da adição de aproximadamente 10 mL de DCM. Posteriormente 3 mmol (0,3036 g) de TEA foram lentamente adicionados ao balão. A reação foi mantida sob agitação em t.a. por 1-2 horas, e ao final a mistura foi lavada com água destilada (3 x 15 mL). A fase orgânica foi separada, seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada sob pressão reduzida.

Tabela 2 - Dados experimentais referentes à síntese das ureídas

Composto	Alquilamina correspondente	Massa utilizada (g)	Rendimento
2a	2-cloroetilamina (1a)	0,3480	0,5637 g (88 %)
2b	3-cloropropilamina (1b)	0,3968	0,5370 g (79 %)



1-benzil-3-(2-cloroetil)ureia (2a): R_f = 0,52 (hexano/acetato de etila 1:1); sólido branco. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.32 – 7.25 (m, 5H), 5.04 (s, 1H), 4.45 – 4.35 (m, 3H), 4.28 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 3.79 (t, J = 8.5 Hz, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 158.00, 138.98, 128.66, 127.40, 127.37, 44.97, 44.49, 42.13.



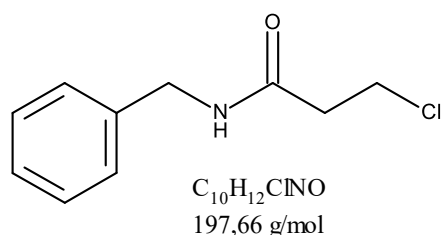
1-benzil-3-(3-cloropropil)ureia (2b): $R_f = 0,49$ (hexano/acetato de etila 1:1); sólido amarelado. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.24 (m, 5H), 5.55 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.24 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.48 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.21 (dd, $J = 12.3, 6.1$ Hz, 2H), 1.93 – 1.77 (m, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 158.81, 139.37, 128.57, 127.21, 44.24, 42.48, 37.52, 32.85.

6.2 Síntese das benzilamidas

Em um balão de 25 mL, foram adicionadas quantidades equimolares (3 mmol) do ácido carboxílico correspondente (Tabela 3), de EDC.HCl (0,5751 g) e do HOBt.xH₂O (0,4594 g), os quais foram dissolvidos em aproximadamente 10 mL de DCM. A reação foi mantida sob agitação em t.a. por 2 horas, e em seguida 3 mmol (0,3215 g) de benzilamina foram adicionados. A reação foi mantida sob agitação *overnight*, e ao final a mistura foi lavada com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 15 mL), seguido de HCl 1 M (2 x 15 mL) e água destilada (1 x 15 mL). A fase orgânica foi separada, seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada sob pressão reduzida.

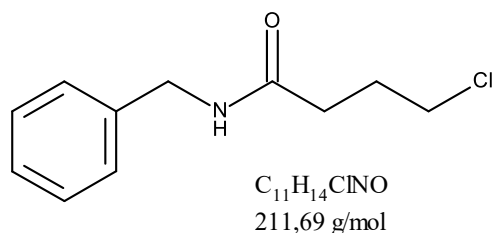
Tabela 3 - Dados experimentais referentes à síntese das benzilamidas

Composto	Ácido carboxílico	Massa utilizada (g)	Rendimento
4a	Ácido 3-cloropropanoico (3a)	0,3256	0,2835 g (48 %)
4b	Ácido 4-clorobutanoico (3b)	0,3677	0,2464 g (39 %)



N-benzil-3-cloropropanamida (4a): $R_f = 0,47$ (hexano/acetato de etila 3:1); sólido amarelado. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.38 – 7.19 (m, 5H), 6.47 (s, 1H), 4.40 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H),

3.76 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 169.49, 137.95, 128.71, 127.74, 127.56, 43.71, 40.16, 39.51.



N-benzil-4-clorobutanamida (4b): $R_f = 0,41$ (hexano/acetato de etila 3:1); óleo amarelado. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.29 (dt, $J = 12.4, 7.0$ Hz, 5H), 6.17 (s, 1H), 4.40 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.16 – 2.03 (m, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 171.60, 138.16, 128.76, 127.79, 127.58, 44.53, 43.68, 33.19, 28.13.

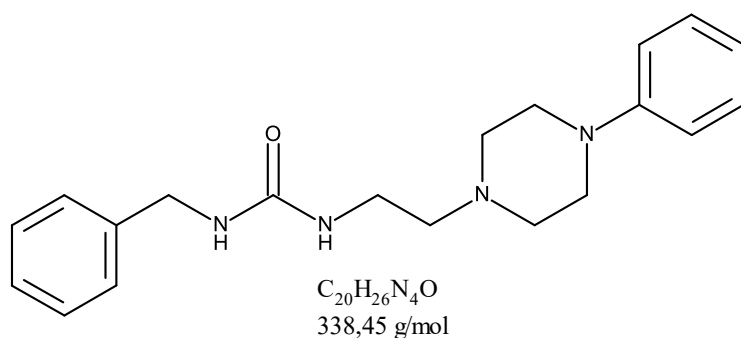
6.3 Síntese dos compostos finais

Em um balão de 25 mL foram adicionadas quantidades equimolares (1 mmol) do intermediário correspondente (Tabela 4), de iodeto de potássio (0,138 g) e carbonato de potássio (0,166 g), além de 2 mmol de 1-fenilpiperazina ou 1,4-piridilpiperazina (Tabela 4) em cerca de 15 mL de acetonitrila. A mistura foi mantida em refluxo sob agitação vigorosa por 24 horas. Ao final, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila, e lavado com água destilada (3 x 15 mL). A fase orgânica foi separada, seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada sob pressão reduzida.

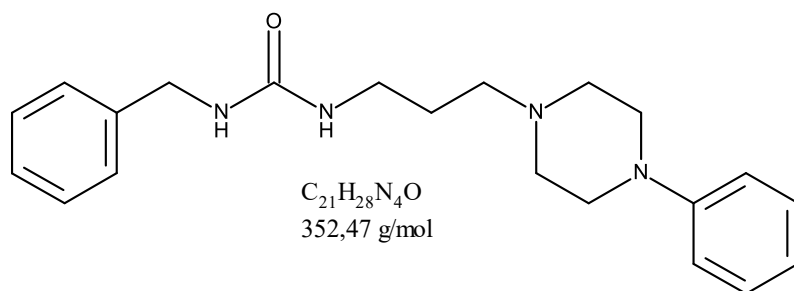
Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel 60, utilizando DCM/MeOH como eluente, para fornecer os produtos finais **5a-d** com pureza adequada.

Tabela 4 - Dados experimentais referentes à síntese dos compostos finais

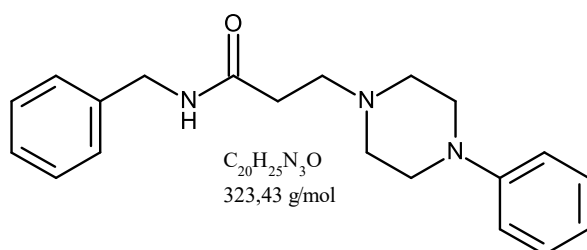
Composto	Intermediário correspondente	Massa utilizada (g)	Massa da piperazina <i>N</i> -substituída	Rendimento
5a	1-benzil-3-(2-cloroetil)ureia (2a)	0,2146	1-fenilpiperazina 0,3308 g	0,2267 g (67 %)
5b	1-benzil-3-(3-cloropropil)ureia (2b)	0,2275	1-fenilpiperazina 0,3490 g	0,1431 g (41 %)
5c	N-benzil-3-cloropropanamida (4a)	0,1169	1-fenilpiperazina 0,2029 g	0,069 g (36 %)
5d	N-benzil-3-cloropropanamida (4a)	0,1984	1-(4-piridil)piperazina 0,3277 g	0,031 g (10 %)



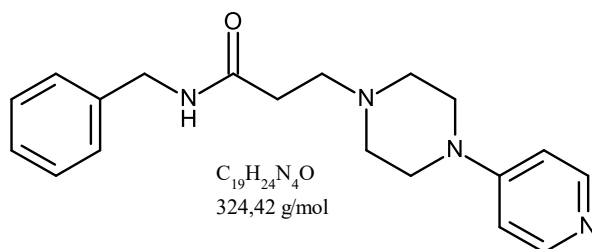
1-benzil-3-(2-(4-fenilpiperazin-1-il)etil)ureia (5a): $R_f = 0,36$ (DCM/MeOH20:1); sólido branco. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.28 – 7.21 (m, 7H), 6.88 - 6.83 (m, 3H), 5.69 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.33 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.27 (dd, $J = 10.9, 5.3$ Hz, 2H), 3.09 – 2.94 (m, 4H), 2.61 – 2.51 (m, 4H), 2.49 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 158.82, 151.16, 139.39, 129.10, 128.63, 127.58, 127.30, 119.82, 116.08, 77.48, 77.06, 76.64, 57.99, 53.01, 48.99, 44.59, 37.55.



1-benzil-3-(3-(4-phenilpiperazin-1-il)propil)ureia (5b): Rf = 0,38 (DCM/MeOH 20:1); sólido branco. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.37 – 7.15 (m, 7H), 6.86 (m, 3H), 5.46 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.38 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.28 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 3.07 (m, 4H), 2.53 (m, 4H), 2.45 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.79 – 1.59 (m, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 129.11, 128.61, 127.42, 127.28, 119.90, 116.10, 53.01, 49.14, 44.55, 39.57, 26.54.



N-benzil-3-(4-phenilpiperazin-1-il)propanamida (5c): Rf = 0,52 (DCM/MeOH 20:1); sólido amarelado. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.59 (s, 1H), 7.35 – 7.15 (m, 7H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 3H), 4.43 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.10 – 2.98 (m, 4H), 2.69 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.65 – 2.57 (m, 4H), 2.47 (t, J = 5.9 Hz, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 172.13, 151.01, 138.54, 129.15, 128.70, 127.68, 127.41, 120.10, 116.24, 53.88, 52.45, 49.16, 43.36, 32.08.



N-benzil-3-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)propanamida (5d): Rf = 0,32 (DCM/MeOH 20:1); óleo amarelado. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 8.26 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 8.16 (s, 1H),

7.35 – 7.19 (m, 5H), 6.63 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.43 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.23 – 3.17 (m, 4H), 2.71 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.62 – 2.54 (m, 4H), 2.47 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 171.75, 154.97, 149.30, 138.48, 128.72, 127.70, 127.52, 108.35, 53.84, 51.90, 45.82, 43.44, 32.32.

6.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Em cada poço, foram adicionados 20 μL de solução de AChE 1 U/mL (ou solução tampão nos poços branco), 100 μL de solução de DTNB (3 mM), 40 μL de solução tampão e 20 μL de solução do inibidor **5a-5d**, nas concentrações 1 μM e 100 μM (ou solução tampão nos poços branco e controle). A placa foi então incubada à 37 °C por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 20 μL de solução de ASChI (15 mM). As soluções foram preparadas em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0). As leituras foram feitas por absorbância em 415 nm a cada 3 minutos por 30 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de atividade inibitória da enzima e a relação estatística entre elas foi calculada através do programa GraphPad Prism 5.0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KETTLE, C.; MORTON, D. W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. June, p. 553–565, 2018.
- ALBUQUERQUE, E. X. et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 73–120, 2009.
- ANDERSON, H.; SU, C. W.; WATSON, J. W. Aminolysis Reactions: Mechanism of Aminolysis and Amidinolysis of p-Nitrophenyl Acetate in Chlorobenzene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 2, p. 482–484, 1969.
- ARNOLD, R. G.; NELSON, J. A.; VERBANC, J. J. Recent Advances In Isocyanate Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 57, n. 1, p. 47–76, 1 fev. 1957.
- ATAK, J. R. et al. Molecular Forms of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Human Plasma and Cerebrospinal Fluid. **Journal of Neurochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1845–1850, 1987.
- BAAKMAN, A. C. et al. Central nervous system effects of the histamine-3 receptor antagonist CEP-26401, in comparison with modafinil and donepezil, after a single dose in a cross-over study in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 5, p. 970–985, 2019.
- BAJDA, M. et al. Multi-Target-Directed Ligands in Alzheimer's Disease Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 32, p. 4949–4975, 2011.
- BAJDA, M. et al. Novel carbamate derivatives as selective butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 78, p. 29–38, 2018.
- BAJDA, M. et al. Search for new multi-target compounds against Alzheimer's disease among histamine H3 receptor ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 185, p. 1–13, 2020.
- BALDUCCI, C.; FORLONI, G. Doxycycline for Alzheimer's Disease: Fighting β -Amyloid Oligomers and Neuroinflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. July, p. 1–7, 2019.
- BIGI, F.; MAGGI, R.; SARTORI, G. Selected syntheses of ureas through phosgene substitutes. **Green Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 140–148, 2000.
- BLANDINA, P. et al. Acetylcholine, Histamine, and Cognition: Two Sides of the Same Coin. **Learning and Memory**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2004.
- BÖHM, H. J.; FLOHR, A.; STAHL, M. Scaffold hopping. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, p. 217–224, 2004.
- BOLOGNESI, M. L. et al. Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid- β aggregation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 24–27, 2005.
- BON, S.; VIGNY, M.; MASSOULIE, J. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 6, p. 2546–2550, 1979.
- BONAVENTURE, P. et al. Histamine H3 receptor antagonists: From target identification to drug leads. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 1084–1096, 2007.
- BONINI, J. S. et al. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. **Neural**

Plasticity, v. 2011, 2011.

BORBÉLY, É.; SCHEICH, B.; HELYES, Z. Neuropeptides in learning and memory. **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 439–450, 2013.

BUCCAFUSCO, J. J.; TERRY, J. Multiple central nervous system targets for eliciting beneficial effects on memory and cognition. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 2, p. 438–446, 2000.

BUNCEL, E.; UM, I.-H. The α -effect and its modulation by solvent. **Tetrahedron**, v. 60, n. 36, p. 7801–7825, ago. 2004.

BUTINI, S. et al. Exploiting protein fluctuations at the active-site Gorge of human cholinesterases: Further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3154–3170, 2008.

CAREY, F. A. **Química orgânica: volume 1**. 7^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2011.

CARNAROGLIO, D. et al. One-pot sequential synthesis of isocyanates and urea derivatives via a microwave-assisted Staudinger-aza-Wittig reaction. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 2378–2386, 2013.

CASS, S. P. Alzheimer's disease and exercise: A literature review. **Current Sports Medicine Reports**, v. 16, n. 1, p. 19–22, 2017.

CHI, H.; CHANG, H. Y.; SANG, T. K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018.

CHO, W. et al. Additive effects of a cholinesterase inhibitor and a histamine inverse agonist on scopolamine deficits in humans. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 3, p. 513–524, 2011.

ClinicalTrials.gov. [Site]. Apresenta informações a respeito do ensaio clínico do composto MK0249, sob a identificação: NCT00506077. Disponível em: <
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00506077>. Acesso em: 03 fev. 2021.

ClinicalTrials.gov. [Site]. Apresenta informações a respeito do ensaio clínico do composto GSK239512, sob a identificação: NCT01772199. Disponível em: <
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01772199>. Acesso em: 03 fev. 2021.

ClinicalTrials.gov. [Site]. Apresenta informações a respeito do ensaio clínico do composto CEP-26401, sob a identificação: NCT01903824. Disponível em: <
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01903824>. Acesso em: 03 fev. 2021.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CORRÊA, M. F. et al. Pharmacological characterization of 5-substituted 1-[(2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl)methyl]piperazines: Novel antagonists for the histamine H₃ and H₄ receptors with anti-inflammatory potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. NOV, p. 1–12, 2017a.

CORRÊA, M. F. et al. 1-[(2,3-Dihydro-1-benzofuran-2-yl) methyl]piperazines as novel anti-inflammatory compounds: Synthesis and evaluation on H₃R/H₄R. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 90, n. 2, p. 317–322, 2017b.

CORRÊA, M. F. et al. Pharmacological and SAR analysis of the LINS01 compounds at the human histamine H₁, H₂, and H₃ receptors. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 89–95, 2019.

COSTA, J. S. **Síntese de compostos híbridos tacrina-lofina, tacrina-Tianeptina e dímeros**

BIS(n)-lofinas com potencial aplicação no tratamento da Doença de Alzheimer. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

DANIEL, M. Q. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 955–979, 1987.

DARRAS, F. H. et al. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of Tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and h H3 receptor antagonists. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 225–242, 2014.

DARREH-SHORI, T. Effects of Cholinesterase Inhibitors on the Activities and Protein Levels of Cholinesterases in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's disease: A Review of Recent Clinical Studies. **Current Alzheimer Research**, v. 999, n. 999, p. 1–6, 2009.

DERE, E. et al. Episodic-like and procedural memory impairments in histamine H1 Receptor knockout mice coincide with changes in acetylcholine esterase activity in the hippocampus and dopamine turnover in the cerebellum. **Neuroscience**, v. 157, n. 3, p. 532–541, 2008.

DIAMANT, S. et al. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 23, p. 8628–8633, 2006.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 7, p. a028035, jul. 2017.

DVIR, H. et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 10–22, 2010.

EDWARDS, J. O.; PEARSON, R. G. The Factors Determining Nucleophilic Reactivities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 1, p. 16–24, jan. 1962.

EGAN, M. F. et al. Randomized crossover study of the histamine H3 inverse agonist MK-0249 for the treatment of cognitive impairment in patients with schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 146, n. 1–3, p. 224–230, 2013.

ELLIOTT, M. L. MRI-based biomarkers of accelerated aging and dementia risk in midlife: how close are we? **Ageing Research Reviews**, v. 61, p. 101075, 2020.

FAROOQUI, A. A. Neurochemical Aspects of Neurological Disorders. **Trace Amines and Neurological Disorders: Potential Mechanisms and Risk Factors**, p. 237–256, 2016.

GALE, S. A.; ACAR, D.; DAFFNER, K. R. Dementia. **American Journal of Medicine**, v. 131, n. 10, p. 1161–1169, 2018.

GALICI, R. et al. JNJ-10181457, a selective non-imidazole histamine H3 receptor antagonist, normalizes acetylcholine neurotransmission and has efficacy in translational rat models of cognition. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 8, p. 1131–1137, 2009.

GAREAU, M. G. **Cognitive Function and the Microbiome**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 131

GHAMARI, N. et al. Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists: Where do they go? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 200, p. 69–84, 2019.

GHAMARI, N. et al. In silico and in vitro studies of two non-imidazole multiple targeting agents at histamine H3 receptors and cholinesterase enzymes. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 95, n. 2, p. 279–290, 2020.

GHOSH, A. K.; SHAHABI, D. Synthesis of amide derivatives for electron deficient amines

and functionalized carboxylic acids using EDC and DMAP and a catalytic amount of HOBt as the coupling reagents. **Tetrahedron Letters**, v. 63, p. 1–5, 2020.

GROSSBERG, S. Acetylcholine neuromodulation in normal and abnormal learning and memory: Vigilance control in waking, sleep, autism, amnesia and Alzheimer's disease. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, n. November, p. 1–25, 2017.

HAIDUKEVICH, V. A. et al. Synthesis of Acyl Derivatives of Prolyl-leucinamides. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 82–89, 2020.

HAREL, M. et al. Crystal structure of thioflavin T bound to the peripheral site of Torpedo californica acetylcholinesterase reveals how thioflavin T acts as a sensitive fluorescent reporter of ligand binding to the acylation site. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 25, p. 7856–7861, 2008.

HENDERSON, W. A.; SCHULTZ, C. J. The Nucleophilicity of Amines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 4643–4646, 1 dez. 1962.

HERRING, W. J. et al. Randomized Controlled Study of the Histamine H3 Inverse Agonist MK-0249 in Adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 73, n. 07, p. e891–e898, 15 jul. 2012.

HO, G. J. et al. Carbodiimide-Mediated Amide Formation in a Two-Phase System. A High-Yield and Low-Racemization Procedure for Peptide Synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 3569–3570, 1995.

HOROWSKI, R. et al. (EDS.). **Advances in Research on Neurodegeneration**. Vienna: Springer-Verlag Wien, 2003. v. 10

HU, Y.; STUMPFE, D.; BAJORATH, J. Recent Advances in Scaffold Hopping. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1238–1246, 2017.

HUANG, W. et al. Searching for the Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's disease: Discovery of quinoxaline-based hybrid compounds with AChE, H3R and BACE 1 inhibitory activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 7158–7167, 2011.

INESTROSA, N. C. et al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. **Neuron**, v. 16, n. 4, p. 881–891, 1996.

ISMAILI, L. et al. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 151, p. 4–34, 2017.

JANIK, H.; SIENKIEWICZ, M.; KUCINSKA-LIPKA, J. Polyurethanes. In: DODIUK, H.; GOODMAN, S. H. (Eds.). **Handbook of Thermoset Plastics**. 3^a ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 253–295.

JANKOWSKA, A. et al. Multi-Target-Directed Ligands Affecting Serotonergic Neurotransmission for Alzheimer's Disease Therapy: Advances in Chemical and Biological Research. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 2045–2067, 2017.

JELLINGER, K. A. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 9, p. 1111–1162, 2009.

Jl, W.; SUGA, N. Histaminergic modulation of nonspecific plasticity of the auditory system and differential gating. **Journal of Neurophysiology**, v. 109, n. 3, p. 792–802, 2013.

- JOHNSON, G.; MOORE, S. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 2, p. 217–225, 2005.
- JONCZYK, J. et al. Search for multifunctional agents against Alzheimer's disease among non-imidazole histamine H3 receptor ligands. In vitro and in vivo pharmacological evaluation and computational studies of piperazine derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, n. February, p. 103084, 2019.
- JORAPUR, Y. R.; JEONG, J. M.; CHI, D. Y. Potassium carbonate as a base for the N-alkylation of indole and pyrrole in ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 14, p. 2435–2438, 2006.
- JUAN, S. M. A.; ADLARD, P. A. Ageing and cognition. **Subcellular Biochemistry**, v. 91, p. 107–122, 2019.
- JUG, U. et al. Elementary SN2 reaction revisited. Effects of solvent and alkyl chain length on kinetics of halogen exchange in haloalkanes elucidated by Empirical Valence Bond simulation. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1116, p. 96–101, 2017.
- KANDEL, E. R. et al. (EDS.). **Princípios de Neurociências**. 5^a ed. Porto Alegre: McGraw-Hill Global Education, 2014.
- KANZIAN, T. et al. Nucleophilic reactivities of primary and secondary amines in acetonitrile. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6379–6385, 2009.
- KILIC, B. et al. Design and synthesis of some new carboxamide and propanamide derivatives bearing phenylpyridazine as a core ring and the investigation of their inhibitory potential on in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, n. March, p. 235–249, 2018.
- KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–715, 2004.
- KOLYMPADI MARKOVIĆ, M.; MARKOVIĆ, D.; LACLEF, S. Amide Synthesis by Transamidation of Primary Carboxamides. **Synthesis**, 2020.
- KORABECNY, J. et al. 7-MEOTA–donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 426–438, jul. 2014.
- KREYE, O.; MUTLU, H.; MEIER, M. A. R. Sustainable routes to polyurethane precursors. **Green Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 1431–1455, 2013.
- KUDER, K. et al. Chlorophenoxy aminoalkyl derivatives as histamine H3R ligands and antiseizure agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 53–72, 2016.
- KURZER, F. ARYLUREAS: CYANATE METHOD. **Organic Syntheses**, v. 4, p. 49–53, 1963.
- KUZNETSOV, N. Y. et al. New enolate-carbodiimide rearrangement in the concise synthesis of 6-amino-2,3-dihydro-4-pyridinones from homoallylamines. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 4283–4298, 2016.
- LANE, R. M.; POTKIN, S. G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 101–124, 2006.
- ŁAŻEWSKA, D. et al. Cholinesterase inhibitory activity of chlorophenoxy derivatives—

- Histamine H₃receptor ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 16, p. 4140–4145, 2016.
- ŁAŻEWSKA, D.; KIEĆ-KONONOWICZ, K. Progress in the development of histamine H₃ receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2013-2017). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 3, p. 175–196, 2018.
- LEURS, R. et al. En route to new blockbuster anti-histamines: Surveying the offspring of the expanding histamine receptor family. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 250–257, 2011.
- LIN, C. E. et al. Electrophoretic behavior and pK_a determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, n. 1–2, p. 283–290, 2004.
- LIU, Y. et al. **Competitive Inhibition Mechanism of Acetylcholinesterase without Catalytic Active Site Interaction: Study on Functionalized C60 Nanoparticles via in Vitro and in Silico Assays**. [s.l: s.n.]. v. 9
- LOPEZ, O. L.; KULLER, L. H. **Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. v. 167
- MADISON, S. A.; CARNALI, J. O. pH Optimization of Amidation via Carbodiimides. 2013.
- MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: An embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5–21, 2004.
- MANSVELDER, H. D.; VERHOOG, M. B.; GORIUNOVA, N. A. Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 54, p. 186–193, 2019.
- MARY, A. et al. Potent acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, and structure - Activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 10, p. 1835–1850, 1998.
- MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31–91, 1993.
- MASUOKA, T. et al. Augmentation of Endogenous Acetylcholine Uptake and Cholinergic Facilitation of Hippocampal Long-Term Potentiation by Acetylcholinesterase Inhibition. **Neuroscience**, v. 404, p. 39–47, 2019.
- MAYR, H.; PATZ, M. Scales of Nucleophilicity and Electrophilicity: A System for Ordering Polar Organic and Organometallic Reactions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 9, p. 938–957, 1994.
- MEDAGLIA, J. D.; LYNALL, M.-E.; BASSETT, D. S. Cognitive Network Neuroscience. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 1471–1491, ago. 2015.
- MEGURO, K.; DODGE, H. H. Vascular Mild Cognitive Impairment: Identifying Disease in Community-Dwelling Older Adults, Reducing Risk Factors, and Providing Support. the Osaki-Tajiri and Kurihara Projects. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 70, n. s1, p. S293–S302, 2019.
- MERLOS, M. et al. Structure-activity relationships in a series of xanthine derivatives with antibronchoconstrictory and bronchodilatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 653–658, 1990.

- MOHD SAIRAZI, N. S.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 5–7, 2020.
- MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, 2005.
- MUÑOZ-RUIZ, P. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: New disease-modifying agents for Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 23, p. 7223–7233, 2005.
- NATHANSON, N. M. Muscarinic Acetylcholine Receptors. **Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition**, p. 215–217, 2013.
- NEVILLE, R. G.; MCGEE, J. J. N-Mono- and N,N-Disubstituted Ureas and Thioureas. **Organic Syntheses**, v. 5, p. 801–807, 1973.
- NICOLL, R. A.; MALENKA, R. C. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 115–118, set. 1995.
- NIGST, T. A.; ANTIPOVA, A.; MAYR, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the α -Effect in Hydrazine Reactivities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 18, p. 8142–8155, 21 set. 2012.
- NIROGI, R. et al. Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in brain microdialysis samples by liquid chromatography mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 1, p. 39–48, 2010.
- NITSCHKE, C.; SCHERR, G. Urea Derivatives. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 7a. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. v. 38p. 1–12.
- ORDENTLICH, A. et al. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 23, p. 17083–17095, 1993.
- PANG, Y.-P. et al. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23646–23649, 1996.
- PARKER, A. J. The effects of solvation on the properties of anions in dipolar aprotic solvents. **Quarterly Reviews, Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 163–187, 1962.
- PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 127–135, 2006.
- PEDERSEN, J. E.; BERGQVIST, C. A.; LARHAMMAR, D. Evolution of the muscarinic acetylcholine receptors in vertebrates. **eNeuro**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2018.
- PETROIANU, G. et al. Multiple enzyme inhibitions by histamine H3 receptor antagonists as potential procognitive agents. **Pharmazie**, v. 61, n. 3, p. 179–182, 2006.
- POWER, A. E.; VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 178–193, 2003.
- PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 1, p. 63–75.e2, 2013.
- PROVENSI, G. et al. Neuronal histamine and the memory of emotionally salient events.

British Journal of Pharmacology, v. 177, n. 3, p. 557–569, 2020a.

PROVENSI, G. et al. Neuronal histamine and the memory of emotionally salient events. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 3, p. 557–569, 2020b.

PURÓN-SIERRA, L.; MIRANDA, M. I. Histaminergic modulation of cholinergic release from the nucleus basalis magnocellularis into insular cortex during taste aversive memory formation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 25–28, 2014.

RADDATZ, R. et al. CEP-26401 (Irdabisant), a potent and selective histamine H₃ receptor antagonist/inverse agonist with cognition-enhancing and wake-promoting activities. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 1, p. 124–133, 2012.

RAMASWAMY, S.; COLANGELO, C.; MARKRAM, H. Data-Driven Modeling of Cholinergic Modulation of Neural Microcircuits: Bridging Neurons, Synapses and Network Activity. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 12, n. October, p. 1–14, 2018.

RAYLE, H. L.; FELLMETH, L. Development of a process for triazine-promoted amidation of carboxylic acids. **Organic Process Research and Development**, v. 3, n. 3, p. 172–176, 1999.

ROCHA, S. M. et al. Histamine: A new immunomodulatory player in the neuron-glia crosstalk. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 1 APR, p. 1–7, 2014.

RODRÍGUEZ-SOACHA, D. A.; SCHEINER, M.; DECKER, M. Multi-target-directed-ligands acting as enzyme inhibitors and receptor ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 690–706, 2019.

ROSENBERRY, T. L. et al. Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1–21, 2017.

ROSSI, R. A.; PIERINI, A. B.; PEÑEÑORY, A. B. Nucleophilic substitution reactions by electron transfer. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 1, p. 71–167, 2003.

SAHIN, K. et al. Novel AChE and BChE inhibitors using combined virtual screening, text mining and in vitro binding assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 0, n. 0, p. 000, 2019.

SAMPATHKUMAR, N.; KUMAR, N. V.; RAJENDRAN, S. P. A simple synthesis of dibenzo[b,g][1,8]naphthyridines. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 11, p. 2019–2024, 2004.

SANO, S. et al. Novel deconjugative esterification of 2-cyclohexylideneacetic acids through 4-(pyrrolidin-1-yl)pyridine-catalyzed carbodiimide couplings. **Chemistry Letters**, v. 35, n. 11, p. 1286–1287, 2006.

SAXENA, A. et al. Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 119–120, n. 97, p. 61–69, 1999.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 11, p. 1625–1644, 9 nov. 2006.

SETSHEDI, I. B. Exploring Biological Activity of 4-Oxo-4 H -furo [2 , 3- h] chromene Derivatives as Potential Multi-Target-Directed Ligands Inhibiting. **Biomolecules**, v. 9, n. 736, p. 1–24, 2019.

- SHAO, D. et al. Synthesis and evaluation of tacrine–E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 18, p. 4639–4642, set. 2004.
- SHARMA, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer’s therapeutics (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 2, p. 1479–1487, 2019.
- SOLÍS, H.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E. Neuroanatomía funcional de la memoria. **Arch Neurocién (mex)**, v. 14, n. 3, p. 176–187, 2009.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química orgânica: volume 1**. 12^a ed. Rio de Janeiro: LTC — Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., 2018.
- SOUSA, R. M. et al. Contribution of chronic diseases to disability in elderly people in countries with low and middle incomes: a 10/66 Dementia Research Group population-based survey. **The Lancet**, v. 374, n. 9704, p. 1821–1830, 2009.
- SRINIVASAN, S.; MANISANKAR, P. Formamide as an ammonia synthon in amination of acid chlorides. **Synthetic Communications**, v. 40, n. 23, p. 3538–3543, 2010.
- STONE, T. W. **CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Acetylcholine**. 1st. ed. [s.l.] CRC Press, 1994.
- SUGISAKI, E. et al. The effect of coactivation of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors on LTD in the hippocampal CA1 network. **Brain Research**, v. 1649, p. 44–52, 2016.
- SUSSMAN, J. L.; SILMAN, I. Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, n. 5, p. 721–729, 1992.
- TANG, J.; MOHAN, T.; VERKADE, J. G. Selective and Efficient Syntheses of Perhydro-1,3,5-triazine-2,4,6-triones and Carbodiimides from Isocyanates Using ZP(MeNCH₂CH₂)_sN Catalysts. **J. Org. Chem**, v. 59, n. 17, p. 4931–4938, 1994.
- TEICH, A. F. et al. Translational inhibition of APP by Posiphen: Efficacy, pharmacodynamics, and pharmacokinetics in the APP/PS1 mouse. **Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 4, n. 1, p. 37–45, 17 jan. 2018.
- THANH, B. P. et al. Can one predict changes from SN1 to SN2 mechanisms? **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 32, p. 11392–11401, 2009.
- TITUS, D. J. et al. Positive allosteric modulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a treatment for cognitive deficits after traumatic brain injury. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, p. 1–20, 2019.
- TONG, M. T.; PEACE, S. T.; CLELAND, T. A. Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. JULY, p. 1–16, 2014.
- TREVISAN, K. et al. Theories of aging and the prevalence of Alzheimer’s disease. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- ULIASSI, E. et al. **Medicinal Chemistry of Hybrids for Neurodegenerative Diseases**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.
- UNZETA, M. et al. Multi-target directed donepezil-like ligands for Alzheimer’s disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. MAY, p. 1–24, 2016.
- VIJAYAN, D.; CHANDRA, R. Amyloid Beta Hypothesis in Alzheimer’s Disease: Major

Culprits and Recent Therapeutic Strategies. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 2, p. 148–166, 2019.

VITALE, R. M. et al. In Silico Identification and Experimental Validation of Novel Anti-Alzheimer's Multitargeted Ligands from a Marine Source Featuring a "2-Aminoimidazole plus Aromatic Group" Scaffold. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 1290–1303, 2018.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Química Orgânica: estrutura e função**. 6^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

VOLONTERIO, A.; ZANDA, M. Multicomponent, one-pot sequential synthesis of 1,3,5- and 1,3,5,5-substituted barbiturates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 19, p. 7486–7497, 2008.

WANG, D. et al. Design, synthesis, and evaluation of isoflavone analogs as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 207–220, 2019.

WANG, Y. D. et al. A Novel Parkinson's Disease Drug Candidate with Potent Anti-neuroinflammatory Effects through the Src Signaling Pathway. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 19, p. 9062–9079, 2016.

WAUTERS, E. et al. **Frontotemporal dementia**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

World Health Organization (WHO). [Site]. Apresenta informações relacionadas à demência. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acesso em 15 fev. 2021.

WINGEN, K.; STARK, H. Scaffold variations in amine warhead of histamine H3 receptor antagonists. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 4, p. 483–489, 2013.

WOOLF, N. J. CHOLINERGIC SYSTEMS IN MAMMALIAN BRAIN AND SPINAL CORD. **Progress in Neurobiology**, v. 37, p. 475–524, 1991.

WYKES, A.; MACNEIL, S. L. Synthesis of new Lewis basic room-temperature ionic liquids by monoquaternization of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO). **Synlett**, n. 1, p. 107–110, 2007.

XIE, Q. et al. Bis-(-)-nor-meptazinols as novel nanomolar cholinesterase inhibitors with high inhibitory potency on amyloid- β aggregation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 2027–2036, 2008.

YANG, Y. **Side Reactions in Peptide Synthesis**. 1^a ed. [s.l.] Academic Press, 2015.

YE, N. et al. Further SAR study on 11-O-substituted aporphine analogues: Identification of highly potent dopamine D3 receptor ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1999–2008, 2011.

YU, L. J.; COOTE, M. L. Electrostatic Switching between S_N1 and S_N2 Pathways. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 123, n. 2, p. 582–589, 2019.